

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

UNIDAD DE POSGRADO

**“MONITOREO TERAPEUTICO DE
RIFAMPICINA E ISONIAZIDA”**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Doctor en Farmacia y Bioquímica

AUTOR

Luis Enrique Moreno Exebio

ASESOR

Jorge Arroyo Acevedo

Lima – Perú

2014

Agradecimientos:

A mis padres por ser el ejemplo a seguir
A mi esposa e hijos por su paciencia y apoyo
A mi asesor Dr. Jorge Arroyo Acevedo por sus consejos
A Socios en Salud Sucursal Perú, a través del Dr. Leonid Lecca García, por su invaluable soporte para realizar este trabajo.

ÍNDICE GENERAL

Resumen

Summary

Résumé

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

- 1.1. Situación problemática
- 1.2. Formulación del problema
- 1.3. Justificación teórica
- 1.4. Justificación práctica
- 1.5. Hipótesis
- 1.6. Objetivos
 - 1.6.1. Objetivo general
 - 1.6.2. Objetivos específicos

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

- 2.1. Marco filosófico o epistemológico de la investigación
- 2.2. Antecedentes de investigación
- 2.3. Bases teóricas

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

- 3.1. Reactivos
- 3.2. Equipos
- 3.3. Entidad donde se desarrolló la investigación
- 3.4. Tipo de investigación
- 3.5. Métodos
 - 3.5.1. Población de estudio
 - 3.5.2. Muestra
 - 3.5.3. Muestreo
 - 3.5.4. Criterios de selección de la población a estudiar
 - 3.5.5. Descripción de los procedimientos a realizar
 - 3.5.6. Consideraciones éticas

CAPÍTULO IV: RESULTADOS

- 4.1. Datos demográficos
- 4.2. Monitoreo de los niveles plasmáticos
- 4.3. Correlación de los niveles plasmáticos con la evolución clínica farmacológica
- 4.4. Evaluación posibles causas de falla al tratamiento farmacológico

CAPITULO V: DISCUSIÓN

5.1. Análisis, interpretación y discusión de resultados

CONCLUSIONES

RECOMENDACIONES

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANEXOS

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros farmacocinéticos de rifampicina e isoniazida

Tabla 2. Procedencia de los pacientes enrolados en el estudio

Tabla 3. Rango de edades de los pacientes enrolados

Tabla 4. Prueba de Normalidad para las concentraciones obtenidas

Tabla 5. Comparación de fases y horas de extracción de las medianas de concentraciones obtenidas

Tabla 6. Concentraciones de los antibióticos 2 y 4 horas posterior a la toma de medicamentos

Tabla 7. Identificación de los factores de riesgo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema general de la investigación

Figura2. Distribución porcentual según Red o Micro Red a la que pertenecen los pacientes

Figura 3. Distribución geográfica a nivel Perú del lugar de nacimiento de los pacientes

Figura 4. Dispersión de las concentraciones de rifampicina en los pacientes enrolados a las 2 y 4 horas en las dos fases de tratamiento

Figura 5. Dispersión de las concentraciones de isoniazida en los pacientes enrolados a las 2 y 4 horas en las dos fases de tratamiento

MONITOREO TERAPEUTICO DE RIFAMPICINA E ISONIAZIDA

Resumen

Objetivo: Monitorizar los niveles plasmáticos de rifampicina (RFP) e isoniazida (INH) y correlacionar los resultados con la evolución clínica de pacientes con tuberculosis activa del Programa Nacional de Tuberculosis del Ministerio de Salud. **Material y Métodos:** Se desarrolló un método de cromatografía líquida (HPLC) para la determinación de RFP en plasma. La separación fue realizada por cromatografía de fase reversa con una columna C18 y una fase móvil compuesta por una mezcla de acetonitrilo y solución amortiguadora de fosfato de potasio monobásico 0,05M (38:62 v/v) a 335nm; se empleó como estándar interno rifampicinaquinona (RFP-QN). En INH, el método fue HPLC, la fase móvil fue una mezcla de acetato de amonio 0,05 M pH 6 y agua (99:1 v/v) a 275 nm, empleando nicotinamida como estándar interno. **Resultados:** La mediana de las concentraciones de isoniazida (2,3 µg/mL) estuvieron por debajo de lo recomendado para la dosificación diaria (3-6 µg/mL) y también por debajo (8,2 µg/mL) para la dosificación de dos veces a la semana, siendo lo recomendado (9-18 µg/mL). La mediana de rifampicina encontrados: 34,4 (Primera Fase) y 41,4 µg/mL (Segunda fase), exceden los valores esperados (8-24 µg/mL); sin embargo se logró demostrar que concentraciones por encima de 40,6 µg/mL de RFP están en mayor relación con el éxito del tratamiento al cabo de los 6 meses (p-valor < 0.05). **Conclusión:** Se demostró la utilidad del monitoreo terapéutico para dosar RFP e INH en plasma de pacientes con tuberculosis y determinar aquellos casos con concentraciones por debajo de lo recomendado que constituyen un factor de riesgo para el fracaso terapéutico.

Palabras clave: tuberculosis, rifampicina, isoniazida, Cromatografía líquida, monitoreo de drogas (Fuente BIREME – DeCs – Descriptores en Ciencias de la Salud)

THERAPEUTIC DRUG MONITORING OF RIFAMPIN AND ISONIAZID

Summary

Objective: Monitor plasma levels of rifampicin (RFP) and isoniazid (INH) and correlate concentrations with clinical evolution of patients from National Tuberculosis Program from Ministry of Health, Peru. **Materials and Methods:** A simple, specific, sensible, wide range liquid chromatography method (HPLC) was developed to determine rifampicin in plasma. Separation was done by reverse phase chromatography with a C18 column, using a mixture of acetonitrile and monobasic potassium phosphate 0,05M (38:62 v/v) as mobile phase at 335 nm, rifampin quinone was used as internal standard. A HPLC method was used for INH dosing, a mixture of ammonium acetate 0,05M pH 6 and water (99:1 v/v) as mobile phase at 275 nm and nicotinamide as internal standard. **Results:** Median concentration (2,3µg/mL) for INH were below recommended values for daily administration (3-6 µg/L) and below (8,2µg/mL) from recommended values for twice a week schedule (9-18 µg/mL). Median concentration for RFP 34,4µg/mL (First phase) and 41,4µg/mL (Second phase) exceeded recommended ranges (8-24 µg/mL); concentrations above 40,6µg/mL were related with success outcomes at 6 months (p-value < 0.05). **Conclusions:** This study demonstrated its utility to dose RFP and INH in plasma and determine those cases which are below recommended ranges and constitute a risk for treatment failure.

Key words: Tuberculosis, rifampin, isoniazid, High Pressure LiquidChromatography, drug monitoring (*Fuente: MeSH NLM*)

MONITORAGE THÉRAPEUTIQUE DE RIFAMPICINE ET ISONIAZIDE

Résumé

Objectif: Monitorage concentration plasmatique de rifampicine (RFP) et isoniazide (INH) et évaluer sa corrélation clinique des patients au Programme National de Tuberculose du Ministère de la Santé (MINSa). **Matériaux et Méthodes:** Il fut développé une méthode de chromatographie en phase liquide (HPLC) pour la détermination de RFP en plasma. La séparation fut faite par chromatographie en phase inversée avec une colonne C18 et une phase mobile à 335 nm, composée par un mélange d'acetonitrile et une solution de phosphate de potassium monobasique 0,05M (38:62 v/v). L'étalon interne fut rifampicine quinone (RFP-QN). Pour INH, la méthode fut HPLC et la phase mobile à 275 nm fut un mélange d'acétate d'ammonium 0,05M pH 6 et de l'eau (99:1 v/v), en utilisant nicotinamide comme étalon interne. **Résultats:** La médiane des concentrations d'Isoniazide (2,3 µg/mL) fut en dessous de celle recommandée pour une dose journalière (3-6 µg/mL) et aussi en dessous (8,2 µg/mL) pour une dose à 2 fois par semaine (9-18 µg/mL). La médiane de rifampicine trouvée fut 34,4 (première phase) et 41,4 µg/mL (deuxième phase) et elle est au-dessus des valeurs normales (8-24 µg/mL). Cependant des concentrations de 40,6 µg/mL et plus de RFP ont été responsables de la réussite du traitement après 6 mois (p-valeur < 0.05). **Conclusion:** L'étude a démontré son efficacité pour doser RFP et INH en plasma et déterminer quelques cas avec des concentrations en dessous de celles recommandées, ce que constitue un facteur de risque pour l'échec thérapeutique.

Mots clés: Tuberculose, rifampicine, isoniazide, Chromatographie en phase liquide, monitorage thérapeutique (Source: BVCS)

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1.1 Situación Problemática

A nivel mundial se presentaron 8,6 millones de nuevos casos de tuberculosis(TBC) humana en el 2012; de ese número, 13% se encuentran coinfectados con HIV y 1,3 millones murieron. Geográficamente, la mayoría de casos están en el SurEste de Asia (29%), África (27%) y las regiones del Pacífico Oeste (19%). El número de casos de tuberculosis multidrogo resistente (TBC-MDR) alcanzó 450 000 el año 2012 y de ellos 170 000 pacientes fallecieron. (OMS, 2013, p.1)

En el 2010 se estimaron 267 000 casos de TBC en la Región de las Américas, donde el Perú ocupa el segundo lugar; más de dos tercios de los casos ocurrieron en Sudamérica (69%). La incidencia por 100 000 habitantes fue variable: Haití (230), Surinam (145), Bolivia (135) y Perú (106). Un total de 6200 casos de TBC-MDR fueron notificados en la Región de las Américas en el 2010; siete países (Perú, Brasil, México, Ecuador, Haití, República Dominicana y Colombia) explican más del 80% de los casos estimados. (PAHO, 2011, p. IX)

En el Perú se han hecho considerables progresos en prevención y control de la tuberculosis y son evidentes los logros; la tasa de morbilidad (total de casos) para el año 1990 fue 198,6 x 100 000 habitantes y el año 2012 se reportó 105,2 x 100 000 habitantes. El 2012 hubieron 31 705 casos de TBC, 28 025 de los cuales fueron nuevos;1 225 casos de TBC-MDRy 84 de Tuberculosis Extremadamente Resistente (XDR). Lima y Callao concentran 54% de casos de TBC, 82% de MDR y 89% de XDR. (MINSA, 2013)

A pesar de los logros en el Perú, falta mucho por hacer; la TB MDR(Li J., Burzynski J., Lee Y-A, Berg D., Driver C., Ridzon R. & Munsiff S., 2004, p. 1771), (WHO, 2010 p. 1), la TB XDR(Mitnick C., Shin S., Seung K., Rich M., Atwood S., Furin J....Becerra M., 2008, p. 563), (Raviglione M., Smith I., 2008 p. 657), la comorbilidad TBC/VIH-SIDA, el estigma, la discriminación y lo complicado de las intervenciones técnicas, socioeconómicas y culturales, significan un reto para la mejora continua. La tuberculosis puede afectar a todos por igual, no reconoce edad, sexo, raza o condición social, pero está estrechamente ligada a la pobreza. Las personas más postergadas son las más vulnerables a la tuberculosis

Diferentes análisis históricos subrayan que la mejor forma que tienen los países para enfrentar la batalla contra la tuberculosis es con la implementación de programas integrales de control, de cobertura nacional y altamente eficientes, que usen tecnologías apropiadas y que incorporen a sus actividades rutinarias métodos de monitoreo y evaluación permanentes, que permitan mejorar su operatividad. (OPS, 2006 p. 29), (MINSA, 2013), (Frieden T, Sterling T, Munsiff S, Watt C, Dye C., 2003, p. 895)

En el Perú, no se han implementado métodos de monitoreo terapéutico dentro del Programa Nacional de Tuberculosis del MINSA para evaluar el tratamiento de los pacientes más complicados; esta situación problemática ha llevado a plantear el presente trabajo de investigación.

1.2 Formulación del Problema

El Monitoreo Terapéutico de Fármacos, conocido como TDM por sus siglas en inglés (Therapeutic Drug Monitoring), es una herramienta que permite hacer el seguimiento de aquellos pacientes cuyas concentraciones séricas se encuentran por debajo de lo recomendado y están en mayor riesgo de fracaso al tratamiento, recaídas y aparición de resistencia. (Peloquin C., 2002, p. 2169)

En el presente trabajo se ha realizado el seguimiento de los pacientes a lo largo de los 6 meses de tratamiento, los resultados de las concentraciones de rifampicina e isoniazida estuvieron a disposición del médico tratante; sin embargo los ajustes de dosis no estuvieron autorizados por el Comité de Ética que aprobó el estudio.

Es innecesario emplear TDM para la mayoría de tratamientos, ya que éste es usado principalmente para el monitoreo de fármacos: con estrecho margen terapéutico, con variabilidad farmacocinética, con concentraciones difíciles de ser monitorizadas y aquellos que causan efectos adversos serios. El proceso de TDM se basa en la inferencia que existe una relación definida entre la dosis y la concentración del fármaco en el plasma o la sangre, y entre la concentración y los efectos terapéuticos. (Kang J., Lee M., 2009 p. 1)

El objetivo de TDM es usar concentraciones apropiadas en tratamientos difíciles de manejar para optimizar el resultado clínico de los pacientes en varias enfermedades, incluyendo la tuberculosis; en ese sentido, el presente trabajoplantea determinar la contribución de TDM al Programa de Tuberculosis del MINSA a través del dosaje de rifampicina e isoniazida (las 2 principales drogas de primera línea) en plasma de personas con diagnóstico de tuberculosis y que se encuentren en el Programa del MINSA, para esto se pretende realizar el dosaje a los 5 días (inicio de primera fase)y a los 2 meses(inicio de segunda fase) de tratamiento (Chávez A.M., Blank R., Smith M., Bayona J., Becerra M., Mitnick C., 2004, p. 57), asimismo se realizará una revisión de la historia clínica del paciente al termino de los 6 meses de tratamiento.

¿Los pacientes que fracasan al tratamiento antituberculoso podrían beneficiarse del monitoreo terapéutico a través del dosaje de sus niveles plasmáticos de rifampicina e isoniazida?

1.3 Justificación teórica

El monitoreo terapéutico es el proceso de obtener las concentraciones séricas de un fármaco y modificar la dosis, basados en los resultados y la evaluación clínica para optimizar los beneficios terapéuticos, mientras se minimizan sus riesgos por efectos adversos o toxicidad. El monitoreo terapéutico ha sido aceptado en muchos países para un grupo grande de fármacos, incluyendo los usados en el tratamiento de la tuberculosis. (Peloquin C. 2002, p. 2169)

La mayoría de pacientes responden bien a los fármacos de primera línea; sin embargo, se ha observado que un grupo pequeño de pacientes tienen una pobre respuesta al tratamiento, algunos alcanzan una baja concentración en plasma de estos fármacos, lo que sugiere que estas bajas concentraciones puede contribuir en 2 a 5% de pacientes, con resultados negativos como falla clínica o recaída. (Prakash J., Velpandian T., Pande J., Gupta S., 2003, p. 464), (Mehta J., Shantaveerapa H., Byrd R., Morton S., Fountain F., Roy T., 2001, p. 1523)

El Monitoreo Terapéutico de Fármacos (TDM) es una herramienta valiosa para el manejo de la farmacoterapia de personas con tuberculosis. En el Perú, a pesar de ser uno de los países con más alta tasa de tuberculosis en América Latina (MINSA, 2013), no se utiliza esta herramienta.

La utilización del TDM en pacientes con tuberculosis permitirá usarla al inicio de la terapia y asegurar una adecuada exposición a los fármacos, reduciendo el número de fracasos y la incidencia de TBC MDR y TBC XDR en el Perú.

1.4 Justificación práctica

Se planea utilizar dos métodos simples de cromatografía líquida de alta resolución (High Performance Liquid Chromatography -HPLC), (Moreno-

Exebio L., 2014, p. 56), (Almog T., Mrema I., Gbaj A., Fhid O., Tuati A., 2012, p. 2204)y (Moussa LA, Khassouani CE, Soulaymani R, Jana M, Cassanas G, Alric R, Hue B; 2002) para el dosaje de los fármacos.

Estos métodos pueden ser de fácil implementación en hospitales del MINSA y constituir una herramienta valiosa, junto con los datos clínicos y bacteriológicos del paciente, que permita a los médicos tratar los casos más complicados de tuberculosis.

1.5 Hipótesis

El monitoreo terapéutico es una herramienta útil para evaluar a los pacientes que fracasan al tratamiento antituberculoso de primera línea y que presentan los niveles plasmáticos de rifampicina e isoniazida fuera del rango terapéutico

1.6 Objetivos

1.5.1. Objetivo general

Monitorizar los niveles plasmáticos de rifampicina e isoniazida y correlacionar los resultados con la evolución clínica de pacientes con tuberculosis activa

1.5.2. Objetivos específicos

1. Monitorizar los niveles plasmáticos de rifampicina e isoniazida en pacientes del Programa Nacional de Tuberculosis del MINSA, que acudan a Centros de Salud – Cabeceras de Microrredes – DISA V – Lima Ciudad y Microred Portada de Manchay – DISA II
2. Realizar la correlación de los niveles plasmáticos con la evolución clínico farmacológico de pacientes con tuberculosis activa.
3. Evaluar posibles causas de falla al tratamiento farmacológico.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1. Marco Filosófico o epistemológico de la investigación

La tuberculosis es una enfermedad que presenta diversos desafíos en los servicios de salud: promover la asistencia de calidad, resolutiva y humanizada. Uno de los problemas radica en las características de la población afectada por TBC, pobres y de sectores marginados que no tienen resuelta las condiciones básicas de subsistencia y desarrollo humano integral. Al mismo tiempo sufren discriminación social, es decir sus derechos y dignidad son recortados cotidianamente; el tratar la enfermedad solo desde el punto biomédico ha dejado de lado la raíz socio económico y cultural, y desatendido a la persona en su integralidad. (Van der Linde, 2003)

La hermenéutica es el arte de interpretar las palabras. En la hermenéutica de Heidegger: “La comprensión se mundaniza, se encuentra en todos los momentos de la vida, de modo que somos nosotros los que tenemos el sentido de la existencia. El modo práctico de ser en el mundo, abre las posibilidades de comprensión, de tal manera que el comprender no existiría si no se comprendiese el contexto en que surge”. (Herman, 2002)

Un estudio realizado en Brasil (Araujo E., Moita A., 2009), usando la hermenéutica de Heidegger para evaluar las vivencias de pacientes con TBC y profesionales de salud, encontró que cuando una persona adquiere la enfermedad se establece en ella una gran amenaza: la de ser subyugado por la enfermedad; sobre el miedo, Heidegger señala: “...lo que se teme posee el carácter de amenaza... lo que se teme viene al encuentro porque posee el modo coyuntural de daño... El temor confunde y hace perder la cabeza...” La persona tiene temor a ser rechazado, el de una debilidad física que puede incapacitarlo de realizar sus actividades.

La tuberculosis amenaza la autonomía de las personas(Heidegger, 2000).Otro hallazgo del estudio fue la indiferencia de los profesionales de la salud respecto a las quejas de los pacientes sobre los efectos adversos de los fármacos antituberculosos; estas dificultades de los pacientes, para superar las dificultades del tratamiento, dejan marcas permanentes en su vida.

La indiferencia y el carácter impersonal del espacio asistencial evidencia la preocupación del personal de salud sobre el problema de salud y no sobre la persona que la presenta, el trato impersonal no favorece que se coloque en el horizonte del otro, el del enfermo.

Este aspecto todavía no se enfatizado en los Programas Nacionales (Ayres J., 2007, p. 43); es necesario el dialogo, donde los interlocutores se empeñen en dejar que sus experiencias enriquezcan el tratamiento de una enfermedad que trae implicaciones sanitarias en el ámbito colectivo y personal. La escucha atenta, la adecuación de conductas, la valorización del sentido de cuidarse, que el enfermo trae como experiencia vivencial, son elementos indispensables al cuidado que se pretende ser humanizado.

El filósofo alemán Karl Otto Appelconsidera fundamental la comunicación entre todos los afectados de un problema, el diálogo y la interacción entre los diversos actores son necesarios para llegar a tomar decisiones cuando existe diferencias de opiniones sobre asuntos de la vida concreta. No solo basta con considerar la opinión de aquellos involucrados en el proceso argumentativo, es decir las autoridades de salud y los equipos operativos; sino es necesario tener en cuenta a todos los afectados, es decir los pacientes. (Maliandi R., 1994, p.66)

Otro aspecto a considerar como parte de los derechos humanos es el rol del Estado benefactor, considerándose la asistencia sanitaria como una cuestión pública y política, y como una de sus prioridades; según Rawls, se busca establecer un puente entre la “persona moral”y la “sociedad bien

ordenada” y considera indispensable el reconocimiento de los derechos individuales y sociales primarios. (Rawls J., 1979)

Rawls señala que una sociedad solo podrá ser justa si se cumple el siguiente principio: “Todos los valores sociales – libertad y oportunidad, ingresos y riquezas, así como las bases sociales y el respeto a si mismo habrán de ser distribuidos de manera igual, a menos que una distribución desigual de alguno de los valores, redunde en beneficio para todos, en especial para los más necesitados”.(Gracia D., 1990, p. 194)

El monitoreo terapéutico, que tiene por fin último la individualización de la terapia, está alineado con un enfoque en los derechos humanos de los pacientes, que reconoce que la TBC tiene un profundo arraigo en poblaciones con derechos humanos y dignidad limitados.

La integración de los principios filosóficos y bioéticos de beneficencia, justicia, dignidad, de las personas que forman parte del programa de TBC, requiere que el individuo sea el centro de las políticas públicas. En este enfoque la participación activa y bien fundada de los individuos es un componente esencial. Para esto es necesario reconocer la vulnerabilidad que afecta a los pacientes con tuberculosis: pobreza, marginación y exclusión social. La pasividad del paciente visto en la atención no es por propia decisión sino que es inherente al modelo de atención actual, que recorta su capacidad de ser gestor de su propia vida.

2.2. Antecedentes de la investigación

Metha, et al., 2001, en Estados Unidos, en el Centro de Veteranos de Memphis, al evaluar la eficacia de la dosis estándar de rifampicina en pacientes que respondían lentamente a la terapia directamente observada (DOT), aplicando método de cromatografía líquida para realizar el dosaje de rifampicina, encontraron utilidad en la medición de los niveles plasmáticos de rifampicina en el tratamiento y seguimiento de pacientes

con tuberculosis pulmonar activa y pobre respuesta al tratamiento de rutina DOT. De 124 pacientes nuevos con tuberculosis, 6 presentaron niveles sub terapéuticos de rifampicina; los 6 pacientes respondieron clínicamente, radiográficamente y microbiológicamente después de un incremento de la dosis de rifampicina para alcanzar la concentración sanguínea adecuada.(Mehta J., Shantaveerapa H., Byrd R., Morton S., Fountain F., Roy T., 2001, p. 1523)

En un estudio realizado por Weiner et al., el 2003 cuyo objetivo fue comparar los tratamientos de pacientes con fallas, recaídas o cura en esquemas de una vez por semana y dos veces por semana con isoniazida/rifapentine, se demostró que la isoniazida, juega un rol significativo en los esquemas terapéuticos y que su dosaje es de utilidad para tratar los casos más complicados de TBC. (Weiner M., Burman W., Ernon A., Benator D., Peloquin C., Khan A.... Tuberculosis TrialsConsortium; 2003, p.1346)

En Australia, en el Hospital Westmead de Sydney, se realizó un estudio con el objetivo de establecer y evaluar el servicio de TDM para optimizar la terapia con rifampicina e isonizida, siendo el método para medir las concentraciones de muestras la cromatografía líquida de alta resolución y encuestas para evaluar el servicio, encontrándose que se realizó un ajuste de dosis en 17% de los pacientes evaluados y 83% de los usuarios de este servicio consideraron valioso el monitoreo clínico como herramienta para optimizar las dosis de estas drogas en algunos pacientes. (Ray J., Gardiner I., Marriott D., 2003, p.229)

En el Perú se ha realizado un estudio el año 2012, en pacientes de la ciudad de Lima del programa nacional de tuberculosis del MINSA para determinar la farmacocinética de la rifampicina en pacientes con y sin comorbilidad de diabetes y HIV, encontrándose que la mayoría de la población peruana estudiada mostró valores farmacocinéticos diferentes a los convencionalmente reportados, con retraso en la absorción, bajas

concentraciones plasmáticas, independiente de comorbilidad con HIV o diabetes, las muestras sanguíneas fueron evaluadas por cromatografía líquida de alta resolución en la Escuela de Medicina Tropical de la Universidad de Liverpool, Londres. (Requena-Méndez A., Davies G., Ardrey A., Jave O., Lopez-Romero S., Ward S., Moore D., 2012, p. 2362)

El presente trabajo es el primero en realizar el dosaje de rifampicina e isoniazida en pacientes del Programa Nacional de Tuberculosis en el Perú.

2.3. Bases Teóricas

El monitoreo terapéutico de fármacos (TDM) es la práctica clínica de medir fármacos específicos, a intervalos de tiempo establecidos para mantener una concentración constante en la sangre de los pacientes, optimizando la dosificación individual; se usa principalmente para fármacos de estrecho margen terapéutico, fármacos con marcada variabilidad farmacocinética, fármacos para los cuales es difícil monitorizar sus concentraciones y fármacos conocidos por causar efectos adversos.

El uso de TDM requiere un enfoque combinado que comprende técnicas y análisis farmacéutico, farmacocinético y farmacodinámico. El uso de TDM requiere más que una medición de la concentración sanguínea del fármaco y la comparación con un rango específico; juega un importante rol en el desarrollo de esquema terapéutico seguro y efectivo, y la individualización de dicho esquema. La variabilidad farmacocinética esta relacionada con la adherencia, errores de dosificación, masa, tejidos y fluidos corporales e interacciones medicamentosas; mientras que la variabilidad farmacodinámica se relaciona con la unión fármaco-receptor, factores genéticos y tolerancia. Ambos aspectos farmacocinéticos y farmacodinámicos afectan el efecto clínico de los fármacos.

El proceso de TDM se fundamenta en que existe una relación definida entre la dosis y la concentración sanguínea o plasmática y entre concentración y efectos terapéuticos. TDM comienza cuando el fármaco se prescribe e involucra determinar un régimen de dosificación individual apropiado para la condición clínica y características del paciente como: edad, peso, funcionamiento de órganos vitales y terapia concomitante.

Cuando se interpreta los resultados de un análisis los factores a tener en cuenta son la hora de muestreo en relación a la dosis, historia de dosificación y los objetivos terapéuticos deseados.

El objetivo principal de TDM es usar concentraciones apropiadas tanto al inicio de la terapia como cuando hay cambios de dosificación, de determinados fármacos para optimizar el resultado clínico en situaciones clínicas diversas; sin embargo se pueden conseguir otros objetivos: Evaluar adherencia, evitar toxicidad, monitorizar y detectar interacciones de fármacos, entre otros.

Los criterios para seleccionar un fármaco como candidato para TDM son los siguientes: dificultad para la interpretación de la evidencia clínica de los efectos terapéuticos o tóxicos, una buena correlación entre la concentración plasmática y los efectos terapéuticos o tóxicos o ambos, rango terapéutico estrecho, el fármaco no se metaboliza a metabolitos activos importantes. (Kang J., Lee M., 2009, p.8)

La isoniazida es generalmente absorbida rápidamente del tracto gastrointestinal, la concentración máxima (C_{max}) ocurre a 1-2 horas post dosis cuando se administra con estómago vacío. La isoniazida se metaboliza en el hígado, algunos pacientes pueden experimentar neuropatías y son elegibles para una administración menos frecuente. La absorción de rifampicina es potencialmente la más variable entre los fármacos antituberculosos. El C_{max} es reducido y el tiempo al cual se alcanza (T_{max}) retrasado por comidas grasosas, por eso es recomendable, en cuanto sea posible la administración con estómago vacío. En ambos fármacos se aconseja un monitoreo terapéutico entre las 2 y 6 horas

post dosis porque permite evaluar los valores de C_{max} (típicamente a las 2 horas) y el potencial retraso de su absorción para rifampicina; al igual que la isoniazida, la rifampicina es metabolizada por el hígado, convirtiéndose en unmetabolito activo, desacetilrifampicina. A continuación se presenta en el cuadro N° 1 los parámetros farmacocinéticos de los fármacos estudiados: (Peloquin C. 2002, p. 2176-2177)

Cuadro N° 1. Parámetros farmacocinéticos de rifampicina e isoniazida

Fármaco	Dosis usual adulto	C_{max} plasmática	T_{max} plasmática	Vida media (t_{1/2}) plasmática
Isoniazida	300 mg diaria	3-6 µg/mL	0,75 – 2 h	Polimorfismo Rápido. 1,5 h Lento: 4 h
	900 mg dos veces por semana	9-18 µg/mL		
Rifampicina	600 mg día	8-24 µg/mL	2 h	3 h

En una revisión realizada por Thomson A. se lista grupos de fármacos donde a menudo se requiere monitoreo terapéutico, dentro de estos grupos se encuentran los antituberculosos, especialmente rifampicina; se señala que el monitoreo de las concentraciones puede ayudar a clarificar e identificar quienes necesitan mayores dosis. (Thomson A., 2004)

El uso de TDM en tuberculosis permite a los clínicos tomar decisiones informadas respecto al ajuste de la dosis en terapia, tales ajustes no se requieren en aquellos pacientes que responden al régimen estándar de cuatro fármacos. No obstante, algunos pacientes que responden lentamente al tratamiento, que tienen una mala absorción, están en riesgo de interacciones medicamentosas o tienen otras enfermedades concomitantes que complican la situación clínica pueden beneficiarse de TDM e intervenciones oportunas pueden evitar el desarrollo de resistencia.

TDM es solamente una parte del cuidado de los pacientes con tuberculosis, en forma aislada, es de un valor limitado. Sin embargo, combinado con datos clínicos y bacteriológicos, puede ser una herramienta decisiva, permitiendo a

los médicos tener éxito en el tratamiento de pacientes más complicados. (Peloquin C., 2003, p. 1724)

A partir de 1990 en adelante, TDM ha sido aceptado para evaluar pacientes con TBC. El principal aspecto es seleccionar los mejores candidatos para TDM, típicamente los pacientes más enfermos o aquellos que responden lentamente al tratamiento; sin embargo, otros aspectos son el tiempo de muestreo y la técnica analítica a emplear.

Si un paciente recibe un fármaco a dosis repetidas, como en los esquemas de tratamiento de TBC, el fármaco y sus metabolitos se acumulan en el cuerpo, eventualmente cuando la cantidad administrada es igual a la cantidad eliminada, se alcanza un equilibrio o “estado estable”. El tiempo requerido para alcanzar el “estado estable” depende solamente de la vida media del fármaco, después de cinco vidas medias, casi 95% del fármaco se habrá acumulado y para propósitos prácticos el “estado de equilibrio” se habrá alcanzado. Las muestras de sangre se toman generalmente cuando se ha alcanzado el equilibrio. (Bauer L. 2008 p. 18) (Tomlin M. 2010 p.34-35)

Los laboratorios desarrollan una variedad de métodos para realizar sus dosajes que varían desde el radioinmunoensayo hasta la cromatografía líquida (HPLC). Actualmente la mayoría de dosajes se realiza por métodos de radioinmuno ensayo. Los métodos más comunes son: Inmuno ensayo de polarización fluorescente (FPIA), inmunoensayo enzimático (EMIT) y ensayo inmunosorbente ligado a enzimas. (ELISA) (Shargel L., Wu-Pong S., Yu A. 2004, ch 20)

En general, los programas de TBC no tienen muchos recursos, así que invertir en realizar TDM no parece muy razonable con los métodos arriba señalados, pero si comparamos el costo de TDM con los costos de re tratamiento de pacientes o de tratar pacientes TBC-MDR, el TDM resulta tener una relación favorable costo beneficio.

El presente trabajo pretende utilizar el TDM en pacientes con tuberculosis sin factores de riesgo para resistencia y que se encuentren en tratamiento anti-tuberculoso con drogas de primera línea. El esquema de primera línea tiene 2 fases, en la primera fase el paciente toma 4 fármacos: rifampicina, isoniazida, pirazinamida y etambutol, de manera diaria de lunes a sábado y en la segunda fase el paciente toma solo isoniazida y rifampicina 2 veces por semana (MINSA, 2006). La detección temprana de personas que no alcanzan concentraciones plasmáticas adecuadas de los dos principales fármacos antituberculosos, permitirá rápidamente un ajuste de dosis y un mayor porcentaje de curación. Asimismo se pretende utilizar una técnica de HPLC previamente validada, la cual es de bajo costo y fácil implementación, lo cual permitirá usarla al inicio de la terapia para asegurar una adecuada exposición a los fármacos.

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

3.1. Reactivos

Se utilizó estándares primarios de RFP, rifampicinaquinona (RFP QN), isoniazida, nicotinamida, pirazinamida y etambutol de la USP (UnitedStatesPharmacopeia); acetonitrilo (J.T. Baker, USA) y metanol grado HPLC (J.T. Baker, México), fosfato de potasio monobásico, acetato de amonio, ácido acético y ácido fosfórico (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), ácido tricloroacético (Sigma Aldrich), fueron de grado analítico y agua grado HPLC (18.2 MΩ) obtenida a través de un equipo purificador de agua SartoriusStedimBiotech, Gottingen, Germany, modelo arium® 611 UV.

3.2. Equipos

El sistema HPLC (LaChrom Elite® HPLC System) empleado para el análisis estuvo conformado por: una bomba (L-2130), detector de arreglo de diodos (L-2455), auto muestreador con sistema de enfriamiento (L-2200) y un horno para columna (L-2350). El software para la recolección y procesamiento de la información fue EZ Chrom Elite® Chromatography Data System, versión 3.2.1.

La columna utilizada para la cuantificación de rifampicina fue una C18 (PurosphereStar®) 150 X 4.6 mm ID, 5 μm tamaño de partícula (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), con una pre columna 4-mm L X 3.0mm ID (Lichrospher 100 RP-18e, 5 μm, Merck KGaA, Darmstadt, Germany). La fase móvil estuvo compuesta por una mezcla de acetonitrilo y solución amortiguadora 0,05M de fosfato de potasio monobásico (0,05 mol/L de fosfato de potasio monobásico KH₂PO₄ ajustado a pH 3,7 con ácido fosfórico) en una proporción 38:62 v/v, con una velocidad de flujo de 1 mL/min a temperatura ambiente. El volumen de inyección y la longitud de onda de cuantificación fueron 20 μL y 335 nm respectivamente.

La columna utilizada para la cuantificación de isoniazida fue una C18 (u-Bondapak®) 150 X 4.6 mm ID, 10 µm tamaño de partícula (Waters), con una pre columna 4-mm L X 3.0mm ID (Supelco 100 RP-18e, 5 µm, USA). La fase móvil estuvo compuesta por una mezcla de una solución amortiguadora 0,05M de acetato de amonio (0,05 mol/L de acetato de amonio ajustado a pH 6,0 con amoniaco) y acetonitrilo en una proporción 99:1 v/v, con una velocidad de flujo de 1 mL/min a temperatura ambiente. El volumen de inyección y la longitud de onda de cuantificación fueron 80 µL y 275 nm respectivamente. En ambos casos (rifampicina e isoniazida) las muestras se mantuvieron en el automuesteador a 5° C durante todo el análisis.

Otros equipos usados fueron: Balanza Analítica, Sartorius con una sensibilidad 0,1 mg, Microcentrífuga MIKRO 220, Hettich, VórtexStuart y Congeladora Hettich (0- 80°C)

3.3. Entidad donde se desarrolló la investigación

El presente estudio fue realizado en el Laboratorio de Biodisponibilidad y Bioequivalencia del Centro Nacional de Control de Calidad (CNCC) – Instituto Nacional de Salud.

3.4. Tipo de Investigación

Analítico, experimental

3.5. Métodos

Se utilizó el método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para llevar a cabo el primer objetivo del estudio: monitorizar los niveles plasmáticos de rifampicina e isoniazida en pacientes del Programa de TBC del MINSA, las características de la población se detallan a continuación:

3.5.1. Población de estudio

Pacientes de 18 años a más con diagnóstico de tuberculosis pertenecientes al Programa Nacional de Tuberculosis del MINSA.

3.5.2. Muestra

204 Pacientes del programa de TBC –MINSA que acudan a Centros de Salud – Cabeceras de Microrredes – DISA V – Lima Ciudad y MicroRed Portada de Manchay – DISA II.

3.5.3. Muestreo

Por conveniencia, tipo consecutivo

3.5.4. Criterios de selección de la población a estudiar

Criterios de inclusión

- Pacientes de 18 años a más con diagnóstico de tuberculosis.
- Que reciban un esquema de tratamiento para tuberculosis con fármacos de primera línea por al menos 05 días y de forma regular.
- Acepten quedarse en el establecimiento de salud (EE.SS) hasta por 2-4 horas posterior a la toma regular de medicamentos
- Acepten firmar el consentimiento informado

Criterios de exclusión

- Embarazo
- Quienes han participado de cualquier estudio experimental o han ingerido cualquier droga experimental dentro de los 3 meses que anteceden al inicio de este estudio.
- Tiene historia de abuso de alcohol o drogas ilícitas, o ingiere bebidas alcohólicas
- El paciente ingiere más de 5 tazas de café o té por día.
- El paciente es fumador
- El paciente tiene cualquier condición que lo impida de participar del estudio según criterio del investigador.

3.5.5. Descripción de los procedimientos a realizar

1. Validación del procedimiento analítico para rifampicina

Se realizó la validación del método para la cuantificación de rifampicina, teniendo en cuenta los parámetros recomendados por la Guía de la Food and Drug Administration (FDA) para la Validación de Métodos Bioanalíticos (CDER, FDA, 2001) y de la Agencia Europea del Medicamento (EMA, 2011). En estas guías se señalan que los parámetros principales de validación son la selectividad, exactitud, precisión, recuperación, curva de calibración y estabilidad.

En el caso del método para rifampicina se adaptó y modificó el método descrito por Prakash J., Velpandian T., Pande J., Gupta S., 2003; el método desarrollado ha sido publicado en la Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública. (Moreno-Exebio L., 2014).

2. Validación del procedimiento analítico de isoniazida

Para la cuantificación de Isoniazida, se utilizó el método validado de Almog T., Mrema I., Gbaj A., Fhid O., Tuati A., 2012.

3. Enrolamiento de pacientes

La captación de los pacientes se realizó por medio de invitación a las personas que acuden a los Centros de Salud – Cabeceras de Microrredes – DISA V – Lima Ciudad y MicroRed Portada de Manchay – DISA II, que forman parte del Programa Nacional de TBC del MINSA. Los voluntarios que cumplieron con los criterios de inclusión fueron considerados aptos para continuar con el estudio.

4. Toma de muestra

Se indicó a los voluntarios que se presenten al Centro de Salud antes de la toma de los medicamentos: rifampicina e isoniazida.

En el Centro de Salud, se supervisó la ingesta de ambos medicamentos. Se colectó 5 mL de sangre el 5to día de tratamiento (Primera fase) y a los 2 meses (Segunda fase) a las 2 y 4 horas post ingesta.(Chang K.C, Leung C.C., Yew W.W, Kam K.M., Yip C.W, Ma C.H.,... Leung W.M.; 2008 p. 467), (HeysellS., Moore J., Keller S.,Houpt E., 2010), (Pea F., Milaneshi R, Baraldo M, Tammalssons G, Furlanut M., 1999), (Holdiness M., 1984). Se muestra Figura 1 con esquema de la investigación:

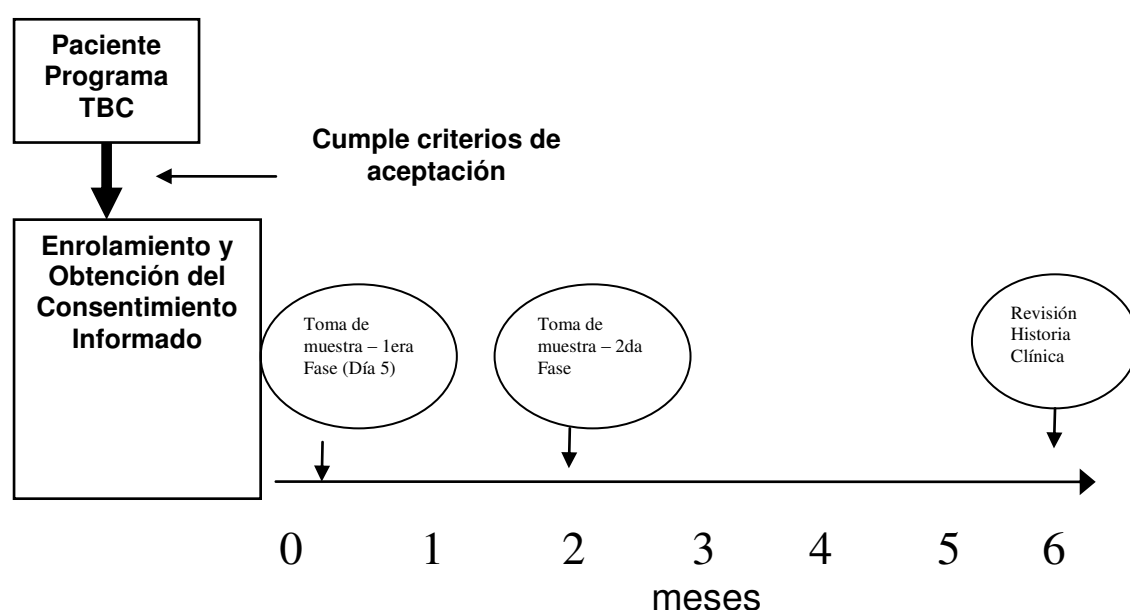


Figura 1. Esquema de la investigación

Se centrifugó las muestras a 3500 g (gravedades) por 7 minutos para obtener el plasma (Allanson A.L, Cotton M.M., Tettey J.N.A, Boyter A.C; 2007). Las muestras de plasma fueron almacenadas en crioviales en el congelador del Centro de Salud para luego ser transportadas conservando la cadena de frío al CNCC y ser almacenadas a -70 °C. Los frascos con plasma fueron identificados con sus iniciales (nombres y apellidos), hora de colecta de sangre (2 o 4 horas) y fecha de la extracción (año/mes/día).

En el CNCC se elaboró la curva de calibración para rifampicina e isoniazida antes de analizar las muestras, de acuerdo a la metodología señalada en 4.5.1. y 4.5.2.

En relación al segundo objetivo realizar la correlación de los niveles plasmáticos con la evolución clínico farmacológico de pacientes con tuberculosis activa, se aplicaron métodos estadísticos de regresión logística bivariados y multivariados los cuales se explican a continuación:

Tratamiento estadístico de los datos

Las características demográficas y clínicas se analizaron con el estadístico Chi-Cuadrado (χ^2) con un nivel de confianza del 95% y para datos no paramétricos el test de Mann-Whitney, con un nivel de significancia de 0,05.

La normalidad de los datos de concentración de antibióticos en sangre, se realizó usando el estadístico Kolmogorov-Smirnov, con un nivel de significancia de 0,05.

Para la determinación de los factores de riesgo, los valores fueron dicotomizados en normal si el valor estaba dentro o por encima del rango esperado, o bajo si el valor esta por debajo del rango esperado.

Se realizó el análisis de regresión logística bivariado y multivariado para determinar los factores de riesgo de bajos niveles de isoniazida o rifampicina. Se trabajó con un nivel de confianza de 95%. La regresión logística resulta útil para los casos en los que se desea predecir la presencia o ausencia de una característica o resultado según los valores de un conjunto de predictores. Es similar a un modelo de regresión lineal pero está adaptado para modelos en los que la variable dependiente es dicotómica. Los coeficientes de

regresión logística pueden utilizarse para estimar la odds ratio (OR) de cada variable independiente del modelo.

Los valores de OR se muestran en tablas de contingencia (TC) para el análisis bivariado y a través de regresión logística (RL) para el análisis multivariado. Se determina los factores de riesgo es decir la correlación entre la característica (concentración) y el evento del estudio (curado o no curado) cuando los factores protectores son significativos ($p < 0.05$) a un intervalo de confianza de 95% (IC95%).

Los datos fueron analizados utilizando el software IBM® SPSS® Statistics versión 19.

3.5.6. Consideraciones éticas

- El protocolo y el formato de consentimiento informado fueron aprobados por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Salud. En los anexos 1, 2 y 3, se adjunta resolución de aprobación, adenda y extensión del estudio.
- Se les explicó a los pacientes, de manera clara en qué consistió el estudio, la explicación se realizó en un ambiente separado del programa para otorgarle privacidad al potencial voluntario. El potencial voluntario pudo llevar el formulario de consentimiento informado a su domicilio para discutir su participación con el resto de su familia.
- No hubo pago a los participantes
- El dosaje de isoniazida y rifampicina fue gratuito
- La información difundida y obtenida es considerada confidencial y fue tratada en todo momento como tal.
- Una copia de los resultados del dosaje de fármacos (isoniazida y rifampicina) fue proporcionada a los participantes y otra copia se le entregó al médico tratante.

Finalmente, para lograr el tercer objetivo evaluar posibles causas de falla tratamiento, se revisaron las historias clínicas para valorar su condición de egreso: curado o no curado al cabo de los seis meses de tratamiento.

CAPITULO IV: RESULTADOS

4.1. Datos demográficos

Se enrolaron 204 pacientes del Programa de Tuberculosis del Ministerio de Salud, del esquema para tuberculosis sensible, que incluye el tratamiento con isoniazida y rifampicina, de los cuales 40 (19,6%) pacientes abandonaron finalmente el tratamiento.

Los pacientes procedieron de la Red Los Olivos-Rímac-San Martín de Porres (DISA V) y de la Micro Red Portada de Manchay (DISA II); el detalle de cada uno de los establecimientos se muestra a continuación en la tabla 2:

Tabla2. Procedencia de los pacientes enrolados en el estudio

RED	ESTABLECIMIENTO DE SALUD	Nº
Los Olivos	C.S JUAN PABLO II CONFRATERNIDAD	7
	C.S LOS OLIVOS	7
	C.S PRIMAVERA	9
	C.S VILLA DEL NORTE	5
	CLAS LAURA CALLER	5
	CLAS SAN MARTIN CONFRATERNIDAD	10
	P.S LOS OLIVOS DE PRO	13
	Total Los Olivos	56
Rímac	C.S CAQUETA	5
	C.S CIUDAD Y CAMPO	9
	C.S FLOR DE AMANCAES	25
	C.S MARISCAL CASTILLA	1
	C.S SAN JUAN DE AMANCAES	10
	C.S. CAQUETA	1
	P.S LEONCIO PRADO	11
	Total Rímac	62
San Martín de Porras	C.S PERU IV ZONA	4
	C.S AMAKELLA	3
	C.S GUSTAVO LANATTA	7
	C.S LOS LIBERTADORES	20
	C.S PERU III ZONA	9
	C.S SAN JUAN DE SALINAS	23
	Total San Martín de Porras	66
Portada de Manchay		20
Total general		204

En la figura 2 se muestra la distribución porcentual según Red o Micro Red de procedencia:

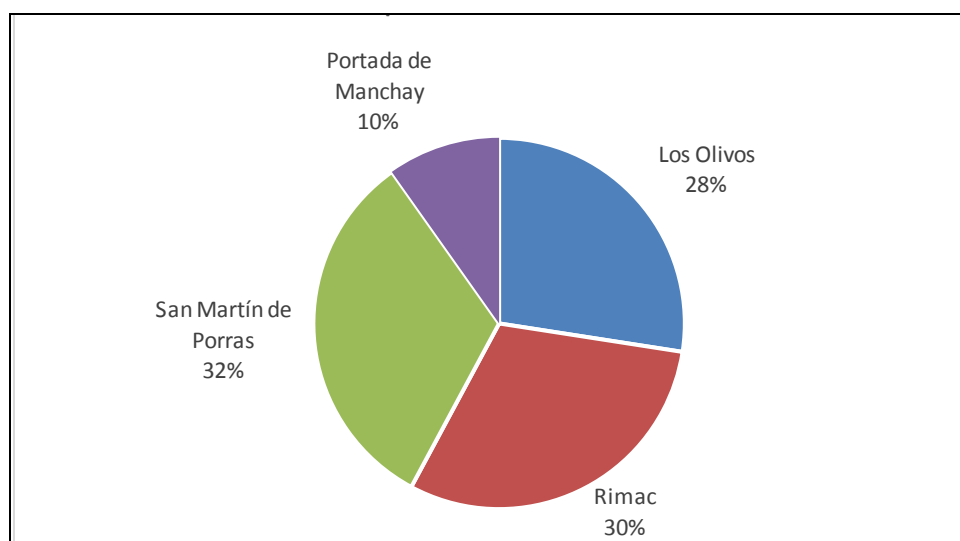


Figura2. Distribución porcentual según Red o Micro Red a la que pertenecen los pacientes

El 66% de los pacientes del estudio fueron varones y 34% mujeres.

En la tabla3, se presenta los grupos etarios de los participantes.

Tabla 3. Rango de edades de los pacientes enrolados

Rango de edad	Frecuencia	Porcentaje
15 - 25	76	37.3
26 - 35	52	25.5
36 - 45	28	13.7
46 - 55	18	8.8
56 - 65	17	8.3
66 - 75	8	3.9
76 - 85	5	2.5
Total	204	100.0

En la figura 3, se presenta el lugar de nacimiento de los pacientes enrolados.

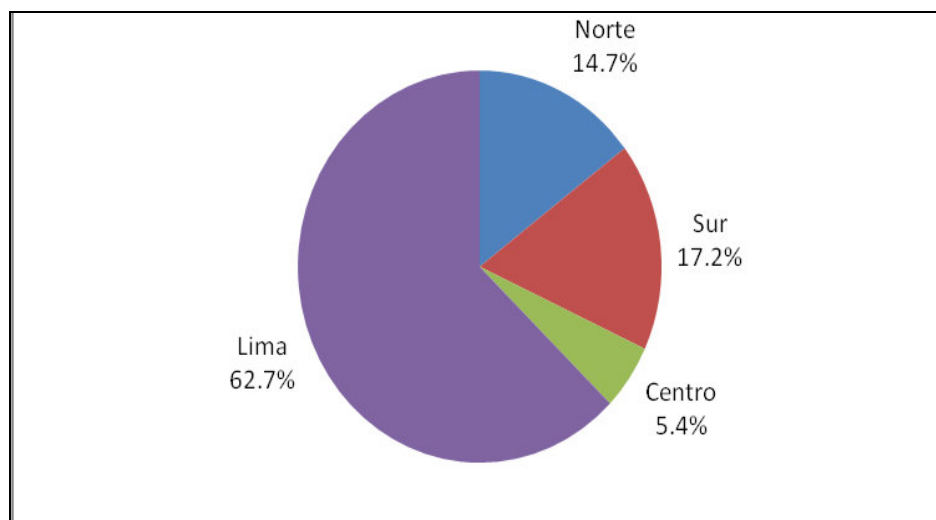


Figura 3. Distribución geográfica a nivel Perú dellugar de nacimiento de los pacientes

4.2. Monitoreo de los niveles plasmáticos

En relación al primer objetivo del estudio: Monitorizar los niveles plasmáticos derifampicina e isoniazida, la dispersión de las concentraciones de los antibióticos en los pacientes luego del tratamiento con los antibióticos se muestran en las figuras 4 y 5

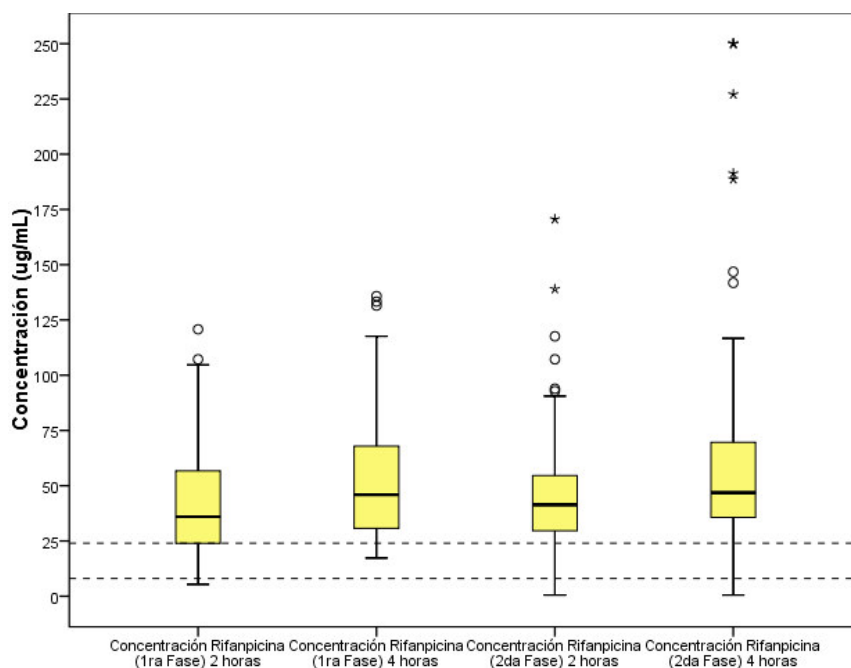


Figura 4. Dispersión de las concentraciones de rifampicina en los pacientes enrolados a las 2 y 4 horas en las dos fases de tratamiento

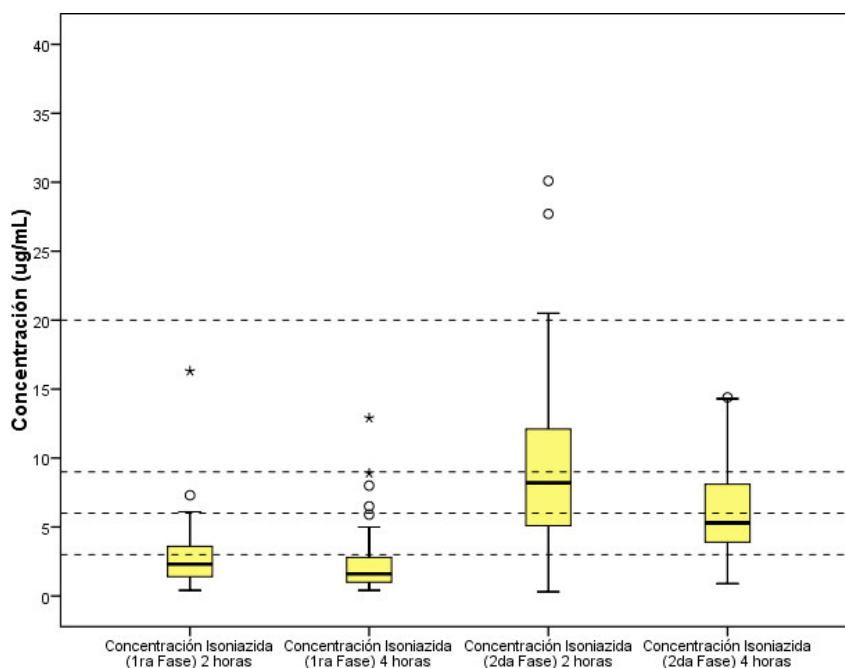


Figura 5. Dispersión de las concentraciones de isoniazida en los pacientes enrolados a las 2 y 4 horas en las dos fases de tratamiento

Respecto a las características que presentó la variable concentración, la tabla 4 muestra la prueba de normalidad para los ocho grupos de variables de concentración de antibióticos en sangre, utilizando el estadístico Kolmogorov-Smirnov, con un nivel de significancia de 0,05.

De los ocho grupos que componen los datos del estudio, solo uno se ajusta a una distribución normal ($\alpha = 0,05$), los que corresponden a las 2 horas de la segunda fase del antibiótico isoniazida.

Tabla 4. Prueba de normalidad para las concentraciones obtenidas

Antibiótico	Fase	Hora	n	Media	Mediana	RIC	Mín	Máx	DN (p-valor)
Rifampicina	1ra.	2	204	41,4	34,4	22,2- 55,4	5,4	151,8	0,000
		4	204	51,7	42,3	30,3 - 64,5	10,3	179,1	0,000
	2da.	2	108	46,3	41,4	29,6 - 55,0	0,5	170,6	0,000
		4	108	60,7	46,9	35,6 - 69,9	0,5	250	0,000
Isoniazida	1ra.	2	204	2,7	2,3	1,2 - 3,6	0,4	16,3	0,000
		4	204	2,2	1,7	1,0 - 2,9	0,2	12,9	0,000
	2da.	2	109	9,0	8,2	5,1 - 12,2	0,3	30,1	0,48*
		4	109	6,2	5,3	3,9 - 8,1	0,9	14,4	0,000

* Los datos de esa variable se ajustan a una Distribución Normal.

RIC: Rango intercuartílico

Se compararon las medianas de dos variables para ambos antibióticos: fase y hora de extracción de la muestra. Solo para rifampicina no demostraron diferencia significativa las siguiente dos comparaciones: primera fase a 4 horas con segunda fase a 2 horas, y primera fase a 4 horas con segunda fase a 4 horas. Los resultados de las comparaciones se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Comparación de fases y hora de extracción de las medianas de concentración obtenidas

Fase - Hora	p-valor antibiótico	
	Rifampicina	Isoniazida
Primera – 2 h v.s. Primera – 4 h	0,000	0,003
Primera – 2 h v.s. Segunda – 2 h	0,026	0,000
Primera – 2 h v.s. Segunda – 4 h	0,000	0,000
Primera – 4 h v.s. Segunda – 2 h	0,341*	0,000
Primera – 4 h v.s. Segunda – 4 h	0,117*	0,000
Segunda – 2 h v.s. Segunda – 4 h	0,028	0,000

* No existe diferencia estadística entre las medianas. Estadístico U de Mann-Whitney, con un nivel de significancia de 0,05

Los valores esperados de isoniazida, dosis diaria son 3-6 $\mu\text{g/mL}$ para la toma 2 veces a la semana son 9-18 $\mu\text{g/mL}$ según Heysell S., Moore J., Keller S., Houpt E., 2010.

Los resultados obtenidos para las concentraciones del antibiótico isoniazida fueron clasificados como de respuesta baja cuando las concentraciones estuvieron debajo de 3 $\mu\text{g/mL}$ en la primera fase, como de respuesta normal-alta si las concentraciones fueron iguales o mayores a 3 $\mu\text{g/mL}$. La clasificación para los resultados de la segunda fase será: como respuesta baja cuando las concentraciones son menores a 9 $\mu\text{g/mL}$ y como de respuesta normal-alta cuando las concentraciones fueron iguales o mayores de 9 $\mu\text{g/mL}$.

Para el antibiótico rifampicina, tanto para la primera fase como para la segunda, las concentraciones fueron dicotomizadas como respuestas bajas a las concentraciones menores a 40,6 $\mu\text{g/mL}$ (mediana general de las concentraciones obtenidas) y como respuesta normal-alta a las que fueron iguales o mayores a 40,6 $\mu\text{g/mL}$.

Siguiendo los criterios arriba señalados para isoniazida y rifampicina y a los objetivos del presente estudio, se muestran los resultados de los pacientes en

la tabla 6. La columna que señala: “Sin respuesta (perdidos)”, corresponde a los pacientes a los cuales no se les pudo tomar muestras en la segunda fase.

Tabla 6. Concentraciones de los antibióticos 2 y 4 horas posterior a la toma de los medicamentos

Antibiótico	Fase	Hora	n Total	n Respuesta baja	n Respuesta normal	n Respuesta alta	Sin respuesta (perdidos)
Isoniazida	1ra.	2	204	122 (59.8%)	73 (35.8%)	9 (4.4%)	0 (0.0%)
		4	204	154 (75.5%)	44 (21.6%)	6 (2.9%)	0 (0.0%)
	2da.	2	204	62 (30.4%)	43 (21.1%)	4 (2.0%)	95 (46.6%)
		4	204	90 (44.1%)	19 (9.3%)	0 (0.0%)	95 (46.6%)
Rifampicina	1ra.	2	204	126 (61.8%)	0 (0.0%)	78 (38.2%)	0 (0.0%)
		4	204	96 (47.1%)	0 (0.0%)	108 (52.9%)	0 (0.0%)
	2da.	2	204	52 (25.5%)	0 (0.0%)	56 (27.5%)	96 (47.1%)
		4	204	38 (18.6%)	0 (0.0%)	70 (34.3%)	96 (47.1%)

4.3. Correlación de los niveles plasmáticos con la evolución clínica farmacológica

En referencia al segundo objetivo: La correlación de los niveles plasmáticos con la evolución clínico farmacológica de pacientes con tuberculosis activa, es decir los factores de riesgo, las variables correspondientes a las características sociodemográficas y las variables de concentración de los dos antibióticos fueron comparadas con el estadístico Chi-Cuadrado (χ^2) con un nivel de confianza del 95%.

Para determinar la existencia de factores de riesgo frente la condición del paciente curado o no curado, se utilizó regresión logística bivariada y multivariada. Se trabajó con un nivel del confianza de 95%. De acuerdo a los resultados encontrados en la tabla los valores de OR (Odds Ratio) para el análisis bivariado a través de las tablas de contingencia (TC) se identificó dos factores protectores RFP 1F 2H y RFP 1F 4H; en el análisis multivariado a través de la regresión logística (RL), no se identificó ningún factor de riesgo, es decir no hay asociación entre el factor de riesgo (característica) y el evento de estudio (curado o no).

La identificación de dos factores protectores RFP 1F 2H y RFP 1F 4H, se interpreta de la siguiente manera: la presencia de la característica $\geq 40,6\mu\text{g/mL}$ tiene relación con la condición de curado, sin embargo al realizar el análisis multivariado con la RL estas dos características no fueron significativas en el modelo completo. En el análisis de RL no se incluyeron las variables RFP 2F 2H, RFP 2F 4H, INZ 2F 2H y INZ 2F 4H dado que las frecuencias encontradas en las tablas de contingencia son menores a 5. Ver Tabla 7.

Tabla 7. Identificación de los factores de riesgo

Variables	Categoría	Curado	No curado	TC: OR (IC 95%), p-valor	RL: OR (IC 95%), p-valor
MicroRed	San Martín de Porras	36 (30,5%)	16 (34,8%)	Categoría de referencia	Categoría de referencia
	Rimac	37 (31,4%)	16 (34,8%)	1,028 (0,448 – 2,360); 0,984	1,058 (0,449 – 2,497); 0,897
	Los Olivos	28 (23,7%)	14 (30,4%)	0,889 (0,372 – 2,164); 0,791	1,270 (0,498 – 3,239); 0,617
	Portada de Manchay	17 (14,4%)	0 (0,0%)	-- **	-- **
Sexo	Femenino	40 (33,9%)	15 (32,6%)	Categoría de referencia	Categoría de referencia
	Masculino	78 (66,1%)	31 (67,4%)	1,060 (0,513 – 2,188); 0,875	1,102 – (0,509 – 2,386); 0,806
Edad	< 30 años	53 (44,9%)	26 (56,5%)	Categoría de referencia	Categoría de referencia
	≥ 30 años	65 (55,1%)	20 (43,5%)	1,594 (0,802 – 3,168); 0,183	0,584 (0,269 – 1,269); 0,173
Lugar de nacimiento	Otros departamentos	53 (44,9%)	19 (41,3%)	Categoría de referencia	Categoría de referencia
	Lima	65 (55,1%)	27 (58,7%)	1,159 (0,581 – 2,310); 0,676	0,791 (0,356 – 1,758); 0,565
RFP 1F 2H	<40,6 µg/mL	59 (50,0%)	33 (71,7%)	Categoría de referencia	Categoría de referencia
	≥ 40,6 µg/mL	59 (50,0%)	13 (28,3%)	0,394 (0,189 – 0,823); 0,013*	0,575 (0,204 – 1,621); 0,296
RFP 1F 4H	<40,6 µg/mL	42 (35,6%)	26 (56,5%)	Categoría de referencia	Categoría de referencia
	≥ 40,6 µg/mL	76 (64,4%)	20 (43,5%)	0,425 (0,212 – 0,851); 0,016*	0,743 (0,282 – 1,954); 0,547
RFP 2F 2H	<40,6 µg/mL	48 (47,5%)	2 (100,0%)	Categoría de referencia	---
	≥ 40,6 µg/mL	53 (52,5%)	0	-- **	---
RFP 2F 4H	<40,6 µg/mL	34 (33,7%)	2 (100,0%)	Categoría de referencia	---
	≥ 40,6 µg/mL	67 (66,3%)	0	-- **	---
INZ 1F 2H	< 3 µg/mL	70 (59,3%)	30 (65,2%)	Categoría de referencia	Categoría de referencia
	≥ 3 µg/mL	48 (40,7%)	16 (34,8%)	0,778 (0,383 – 1,581); 0,487	0,796 (0,345 – 1,839); 0,594
INZ 1F 4H	< 3 µg/mL	92 (78,0%)	34 (73,9%)	Categoría de referencia	Categoría de referencia
	≥ 3 µg/mL	26 (22,0%)	12 (26,1%)	1,249 (0,567 – 2,749); 0,581	1,927 (0,757 – 4,905); 0,169
INZ 2F 2H	< 9 µg/mL	56 (55,4%)	2 (66,7%)	Categoría de referencia	---
	≥ 9 µg/mL	45 (44,6%)	1 (33,3%)	0,622 (0,055 – 7,084); 0,702	---
INZ 2F 4H	< 9 µg/mL	83 (82,2%)	3 (100,0%)	Categoría de referencia	---
	≥ 9 µg/mL	18 (17,8%)	0 (0,0%)	-- **	---

** La frecuencia de datos es menor de 5 por lo que no es posible obtener resultados consistentes.

4.4.Evaluación de posibles causas de falla al tratamiento farmacológico

En referencia al tercer objetivo: La evaluación de las posibles causas de falla tratamiento: concentraciones subterapéuticas de rifampicina e isoniazida, toxicidad, malabsorción, interacción medicamentosa e incumplimiento del paciente. Se identificó interacción medicamentosa en un paciente con comorbilidad de Diabetes Melitus tipo II y tratamiento de 2 meses con glibenclamida, quien presentó bajas concentraciones de isoniazida durante el tratamiento.

Asimismo se encontró un retraso en la absorción de rifampicina, se observa en la tabla 4 que la mediana de concentraciones de rifampicina a las 2 horas fue menor: 34,4 µg/mL en comparación con las 4 horas: 42,3 µg/mL en la primera fase; lo mismo ocurrió en la segunda fase, la mediana a las 2 horas fue 41,4 µg/mL y a las 4 horas fue 46,9 µg/mL.

Finalmente, se muestra que las concentraciones de isoniazida y rifampicina a las 2 horas fueron significativamente superiores en la segunda fase del esquema de tratamiento en comparación con la primera fase.

CAPITULO V: DISCUSIÓN

5.1. Análisis, interpretación y discusión de resultados

El presente trabajo de investigación realizó el monitoreo terapéutico de rifampicina e isoniazida; entendiéndose que el monitoreo fármaco terapéutico (TDM) es el proceso de determinar las concentraciones plasmáticas y evaluar los datos clínicos del paciente para optimizarlos beneficios terapéuticos, mientras se minimizan sus riesgos por efectos adversos o toxicidad. (Peloquin, 2002)

En la tabla 4 se muestran los hallazgos al determinar los niveles plasmáticos de rifampicina e isoniazida, objetivo que fue alcanzado completamente. Se determinaron las concentraciones de rifampicina e isoniazida en 204 pacientes del Programa de Tuberculosis del MINSA, observándose que la mediana de las concentraciones de isoniazida, estuvieron por debajo, 2,3 µg/mL de lo recomendado para la dosificación diaria (3-6 µg/mL). En la dosificación de dos veces a la semana se alcanzó una mediana de 8,2 µg/mL, siendo lo recomendado (9-18 µg/mL); estos valores bajos pueden deberse a varias causas: mala absorción, incumplimiento de la terapia, diabetes, entre otros (Peloquin C., 2002, p. 2175). Los valores fueron comparables a otros estudios como por ejemplo el de Heysell S., et al., (2010) quienes encontraron una concentración mediana de 1,9 µg/mL con dosis diaria y 9,8 µg/mL en dosis de dos veces a la semana. (Heysell S, Moore J, Keller S, Houpt E, 2010).

Asimismo se ha encontrado que concentraciones más bajas de isoniazida y rifampicina se encuentran en pacientes TBC-MDR que en pacientes sensibles, esto debido a que se ha descrito que los pacientes TBC-MDR tienen baja absorción intestinal de estos fármacos en comparación con

pacientes sensibles (Barroso E., Pinheira V., Fcanha M., Carvalho M., Moura M., Campelo C...Lima A; 2009, p. 328). En el presente estudio se encontraron 63 pacientes multidrogo resistentes.

En un estudio con 69 pacientes (Um S.W., Lee S.W., Kwon S.Y., Yoon H.I., Park K.U., Song J...Lee J.H; 2007, p. 973), encontraron una concentración promedio de isoniazida de $3,7 \pm 1,7$ $\mu\text{g/mL}$ a las 2 horas, en una población de pacientes de Corea del Sur. En África, (Tappero J., Bradford W., Agerton T., Hopewell P., Reingold A., Lockman S...Peloquin C; 2005, p. 461) encontraron valores promedio de $4,35$ $\mu\text{g/mL}$ en una población de 28 pacientes en Botswana, África. El presente estudio, constituye el primer trabajo en el Perú, en determinar valores plasmáticos de isoniazida y rifampicina simultáneamente para una población peruana.

La mediana de rifampicina encontrada: $34,4$ $\mu\text{g/mL}$, excede los valores esperados ($8-24$ $\mu\text{g/mL}$). En un estudio realizado por (Prakash J, Velpandian T, Pande J, Gupta S.), se encontraron valores medios de rifampicina a las 2 horas de $11,15$ $\mu\text{g/mL}$ ($0,21 - 31,32$ $\mu\text{g/mL}$); sin embargo estos valores se incrementaron hasta un 158% dependiendo de la formulación (marca) de rifampicina utilizada por los pacientes. En un estudio realizado en el Perú se encontró concentraciones bajas de rifampicina en 72 de 105 pacientes estudiados. (Requena-Méndez A., Davies G., Ardrey A., Jave O., Lopez-Romero S., Ward S., Moore D., 2012)

Sobre el método desarrollado y adaptado para realizar el dosaje de rifampicina es importante señalar que este ha sido validado demostrando ser sensible, selectivo y lineal para un amplio rango de concentraciones de RFP en plasma, pudiendo ser de fácil implementación en hospitales del MINSA y constituir una herramienta valiosa, junto con los datos clínicos y bacteriológicos del paciente, que permita a los médicos tratar los casos más complicados de tuberculosis. (Moreno-Exebio L., Grande-Ortiz M., 2014)

Se correlacionaron los niveles plasmáticos con la evolución clínico farmacológico de pacientes con tuberculosis activa, en este estudio se logró demostrar que concentraciones por encima de 40,6µg/mL están en mayor relación con el éxito del tratamiento al cabo de los 6 meses. Existen estudios, que relacionan altas concentraciones de rifampicina con el éxito de tratamiento. (Ruslmi R., Nijland H., Alisjahbana B., Parwati I., Crevel R., Aarnoutse R.; 2007, p. 2551)

Otro hallazgo de este estudio es que las concentraciones en la segunda fase, para isoniazida, fueron significativamente mas altas ($p < 0,05$) a los de primera fase; las medianas de las concentraciones de isoniazida en la segunda fase (dosificación 2 veces por semana) fueron superiores a las de la primera fase (Dosificación diaria). En el caso de rifampicina, las medianas de las concentración en la primera fase fueron: 34,4µg/mL (2h) versus 41,4 µg/mL (2h) en la segunda fase; la diferencia es significativa en este caso, apreciándose valores superiores de concentración de rifampicina en la segunda fase de tratamiento.

El Ministerio de Salud actualizó la Norma Técnica de Salud para la Atención Integral de las personas afectadas por Tuberculosis (NTS N° 104-MINSA/DGSP-V0) en noviembre 2013 (MINSA, 2013); uno de los cambios más significativos fue el aumento de la frecuencia de administración del esquema de primera línea de 2 a 3 veces por semana de rifampicina e isoniazida, lo cual estuvo basado en la sospecha que las concentraciones de ambos antibióticos en la segunda fase estaban por debajo de las concentraciones de la primera fase y esto explicaba el aumento de fracasos y la aparición de multidrogo resistencia.

Este estudio muestra que en el caso de isoniazida y rifampicina (2h) las concentraciones son significativamente superiores en la segunda fase en comparación con la primera y que el cambio de esquema no corresponde a lo encontrado.

El Centro de Enfermedades Transmisibles de Estados Unidos (CDC) mantiene el esquema principal de continuación de la segunda fase, Rifampicina e Isoniazida dos veces por semana por 36 dosis (18 semanas) (CDC, 2013).

Respecto a la evaluación de posibles causas de falla al tratamiento: concentraciones subterapéuticas de rifampicina e isoniazida, toxicidad, malabsorción, interacción medicamentosa e incumplimiento del paciente, se encontró que un paciente con comorbilidad de Diabetes Mellitus tipo II y tratamiento de 2 meses para esa enfermedad, presentó bajas concentraciones de isoniazida durante el tratamiento, esto se corresponde con estudios que muestran evidencia que la diabetes mellitus es un importante factor de riesgo para la tuberculosis y puede afectar la presentación de la enfermedad y la respuesta al tratamiento. (Dooley K., Chaisson R. 2009, pág. 737)

Asimismo, en el caso de rifampicina se observó que la mediana de concentraciones a las 2 horas fue menor: 34,4 $\mu\text{g/mL}$ en comparación con las 4 horas, 42,3 $\mu\text{g/mL}$ en la primera fase; lo mismo ocurrió en la segunda fase, la mediana a las 2 horas fue 41,4 $\mu\text{g/mL}$ y a las 4 horas 46,9 $\mu\text{g/mL}$, lo cual muestra un retraso en la absorción de este medicamento. Este hallazgo fue similar al encontrado por Requena-Méndez A., Davies G., Ardrey A., Jave O., Lopez-Romero S., Ward S., Moore D., 2012, donde las concentraciones a las 6 horas fueron superiores a las 2 horas en 61 de 105 pacientes (62,2%).

La tuberculosis es una enfermedad muy ligada a la pobreza y al hacinamiento, la mayor parte de casos se presenta en las grandes ciudades. Aun cuando la pobreza se ha reducido en el Perú, según cifras del INEI, esta alcanzó el año 2013 al 23,9% (INEI, 2014) de la población, nuestro país ocupa el segundo lugar en las Américas de casos de tuberculosis (MINSA, 2013).

Es importante resaltar que la población de nuestro estudio estuvo constituida por personas mayores de 18 años, lo cual demuestra el fuerte impacto que

tiene esta enfermedad en la población económicamente activa del país (PEA). El costo económico de la tuberculosis en el Perú en el año 2010, ascendió a 80087 millones de US\$, correspondiendo a 42 120 millones de US\$ (52,6%) al costo directo y el costo indirecto a 37 968 millones de US\$ (47,4%). El costo directo fue financiado principalmente por el Estado; los costos indirectos que incluyen los años de vida perdidos por discapacidad luego de culminado el tratamiento, fueron 4 782 millones US\$ (6%), el costo de los días dejados de trabajar o estudiar que fueron 8 589 millones de US\$ (10,7%) y el costo del tiempo de los familiares o voluntarios fueron 1 052 millones de US\$ (1,3%). (MINSA, DGSP, 2012)

El costo para la sociedad compuesto por los años de vida perdidos por muerte (costo indirecto) fue de 23 544 millones de US\$ (29,4%). Además del costo económico que asumen las familias, hay un costo social con implicancias económicas concretas en el paciente, su familia, y en el desarrollo individual y emocional del enfermo. La forma como se distribuye el gasto entre los diferentes actores, marca el derrotero de las acciones a tomar para promover la prevención y control de esta enfermedad (MINSA, DGSP, 2012).

En este sentido, es importante mencionar que del total de pacientes enrolados, 63 pacientes (31%) fueron considerados MDR, lo cual demuestra que no solo es necesario el monitoreo sino realizar pruebas de sensibilidad al inicio del tratamiento para evitar los fracasos, tal como lo describe Chávez A.M., R. Blank R., Smith S., J. Bayona, Becerra M, Mitnick C.; 2004.

Finalmente, es importante señalar que la TB MDR, la comorbilidad de TB/ VIH SIDA, el estigma, la discriminación y lo complicado de las intervenciones técnicas, socioeconómicas y culturales, significan un reto para el mejoramiento del Programa de Tuberculosis del MINSA, (Bonilla C. 2008); esta tesis doctoral pretende aportar pistas para resolver el tema del monitoreo de los pacientes con tuberculosis y servir de base para otros estudios de tipo farmacogenético que expliquen los valores de rifampicina encontrados en este estudio.

CONCLUSIONES

1. Las concentraciones de isoniazida encontradas estuvieron por debajo de los rangos terapéuticos recomendados, tanto en la primera fase (administración diaria) como en la segunda fase (administración dos veces por semana); para el caso de la rifampicina, los valores encontrados sobrepasan los rangos terapéuticos recomendados en la primera y segunda fase.
2. No se encontró correlación de los niveles plasmáticos de isoniazida con la evolución clínico farmacológico de los pacientes. Si se encontró correlación estadísticamente significativa ($p < 0.05$) para el caso de rifampicina: concentraciones por encima de $40,6 \mu\text{g/mL}$ de rifampicina, en la primera fase, están en mayor relación con el éxito del tratamiento al cabo de los 6 meses, según el análisis bivariado aplicado.
3. Se identificó una interacción medicamentosa entre el uso de glibenclamida e isoniazida. Se encontró retraso en la absorción de rifampicina, observándose concentraciones mayores de rifampicina a las 4 horas en comparación con las 2 horas, tanto en la primera como en la segunda fase de tratamiento. Finalmente, se demostró que las concentraciones de isoniazida y rifampicina a las 2 horas son significativamente superiores en la segunda fase del esquema de tratamiento en comparación con la primera fase.

RECOMENDACIONES

1. Se recomienda la selección de otras DISAS, en próximos trabajos para tener un mapa completo de monitoreo en Lima, una región que representa el 58 % de casos de TBC, 82 % de casos de TB MDR y 93 % de casos de TB XDR a nivel nacional.
2. Los métodos para realizar el dosaje pueden ser implementados en los centros de excelencia que viene impulsando el Ministerio de Salud para el tratamiento de pacientes con tuberculosis, porque son métodos rápidos y de fácil implementación.
3. Los pacientes con diabetes mellitus tipo II son candidatos a realizarse el monitoreo terapéutico de acuerdo a los resultados de este estudio.
4. Las concentraciones altas de rifampicina, encontradas en este trabajo sugieren la necesidad de realizar estudios de fármaco genética que permitan determinar las enzimas que pudieran estar afectando el metabolismo de este antibiótico.
5. Es necesario realizar pruebas de sensibilidad a todos los pacientes que ingresan al Programa Nacional de Tuberculosis.

REFERENCIAS

1. Allanson A.L, Cotton M.M., Tettey J.N.A & Boyter A.C (2007). Determination of rifampicin in human plasma and blood spots by high performance liquid chromatography with UV detection: A potential method for therapeutic drug monitoring. *J Pharm Biomed Anal.* Aug 15;44(4):963-9.
2. Almog T., Mrema I., Gbaj A., Fhid O. & Tuati A (2012). Isoniazid Metabolism in Libyan patients using HPLC Method. *J. Chem. Pharm. Res.* 4(4): 2204-08
3. Araujo E. & Moita A (2009). Lo Cotidiano del tratamiento de personas enfermas de tuberculosis en Unidades Básicas de Salud: abordaje Fenomenológico. *Rev Latino-am Enfermagem*, março-abril; 17(2). Recuperado de http://www.scielo.br/pdf/rlae/v17n2/es_07.pdf
4. Ayres J. (2007). Una concepción hermenéutica de saúde. *Rev Saude Coletiva.* 17(1):43-62
5. Barroso E., Pinheira V., Fcanha M., Carvalho M., Moura M., Campelo C... & Lima A. (2009). Serum Concentrations of Rifampin, Isoniazid, and Intestinal Absorption. Permeability in Patients with Multidrug Resistant Tuberculosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 81(2): 322–9.
6. Bauer L. (2008). Applied Clinical Pharmacokinetics. New York. Mc Graw Hill Medical.
7. Bonilla C. (2008). Situación de la tuberculosis en el Perú. *Acta Med. Per* 25(3).
8. Center for Drug Evaluation and Research (CDER) FDA (2001). Guidance on Bioanalytical Method Validation.
9. Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC). Tratamientos para Tuberculosis (2013). Recuperado de <http://www.cdc.gov/tb/esp/topic/treatment/tbdisease.htm>
10. Chang K.C, Leung C.C., Yew W.W, Kam K.M., Yip C.W, Ma C.H.,... & Leung W.M (2008). Peak plasma rifampicin level in Tuberculosis patients with slow culture conversion. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 27: 467-72.

11. Chavez A., Blank R., Smith S., Bayona J., Becerra M. & Mitnick C (2004). Identifying early treatment failure on Category I therapy for pulmonary tuberculosis in Lima Ciudad, Peru. *Int. J. Tuberc. Lung Dis* 8(1):52–8.
12. Dirección General de Salud de las Personas. MINSA (2012). Impacto Socioeconómico de la Tuberculosis en el Perú 2010.
13. Dooley K. & Chaisson R (2009). Tuberculosis and diabetes mellitus: convergence of two epidemics. *Lancet Infect Dis.*; 9: 737–46
14. European Medicine Agency (EMA) (2011). Guideline on Bioanalytical Method Validation. EMEA/CHMP/EWP/192217/2009.
15. Frieden T, Sterling T, Munsiff S, Watt C & Dye C. Tuberculosis (2003). *The Lancet* Sep 13. 362: 887-99.
16. Gracia D. (1990). ¿Qué es un Sistema justo de Servicios de Salud? Principios para la asignación de recursos escasos. Bioética, Temas y Perspectivas. Washington, OPS, p. 194.
17. Heidegger M. (2000) Ser e tempo. Petrópolis (RJ): Vozes
18. Herman N. (2002). Hermenéutica e Educación, Rio de Janeiro; DP&A.
19. Heysell S, Moore J, Keller S & Houpt E. (2010). Therapeutic Drug Monitoring for Slow Response to Tuberculosis Treatment in a State Control Program, Virginia, USA. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 16 (10): 1546-53.
20. Holdiness M. (1984). Clinical Pharmacokinetics of the Antituberculosis Drugs. *Clin. Pharmacokinet.* Nov-Dec; 9 (6):511-44.
21. Instituto Nacional de Estadística e Informática (2014). Nota de Prensa N° 065-02.
22. Kang J.S & Lee M.H. (2009). Overview of therapeutic drug monitoring. *Korean J Intern Med*; 24:1-10
23. Li J., Burzynski J., Lee Y-A, Berg D., Driver C., Ridzon R. & Munsiff S (2004). Use of Therapeutic Drug Monitoring for Multidrug-Resistant Tuberculosis Patients. *Chest*; 126; 1770-6.
24. Maliandi R. (1994). Ética: Conceptos y problemas. Buenos Aires. Biblos, p.66.

25. Mehta J, ShantaveerapaH, Byrd R, Morton S, Fountain F & Roy T (2001). Utility of Rifampicin Blood Levels in the Treatment and Follow-up of Active Pulmonary Tuberculosis in Patients who were Slow to Respond to Routine Directly Observed Therapy. *Chest*; 120:5, 1520-24
26. MINSA (2013). Norma Técnica de Salud para la Atención Integral de las personas afectadas por la Tuberculosis NTS N° 104-MINSA/DGSP-V01.
27. MINSA (2006). Norma Técnica de Salud para la Atención Integral de las personas afectadas por la Tuberculosis NTS N° 041-MINSA/DGSP-V01.
28. MINSA, DGSP (2013). Situación de la Tuberculosis en Perú, 2012. Presentación de la Estrategia Sanitaria Nacional de Prevención y Control de la Tuberculosis. Recuperado de <http://www.tuberculosis.minsa.gob.pe/>.
29. Mitnick C., Shin S., Seung K., Rich M., Atwood S., Furin J....& Becerra M (2008). Comprehensive Treatment of Extensively Drug-Resistant Tuberculosis. *N Engl. J Med.* Aug 7; 359(6):563-74.
30. Moreno-Exebio L., Grande-Ortiz M (2004). Validación de un Método de Cromatografía Líquida para la Determinación de Rifampicina en Plasma Humano. *Rev. Peru. Med ExpSalud.Pública.* Vol.31: 56-61
31. Moussa LA, Khassouani CE, Soulaymani R, Jana M, Cassanas G, Alric R & Hue B (2002).Therapeutic isoniazid monitoring using a simple high performance liquid chromatographic method with ultraviolet detection. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*766:181-7
32. Organización Panamericana de la Salud (2006).Plan Regional de Tuberculosis 2006-2015. Washington DC.
33. Pan-American Health Organization. World Health Organization (2011).Tuberculosis in the Region of the Americas. Regional Report 2011. Epidemiology, Control and Financing.

34. Pea F., Milaneshi R, Baraldo M, Tammalssons G &Furlanut M (1999). Isoniazid and its Hydrazine Metabolite in Patients with Tuberculosis. *Clin. Drug Invest.* Feb; 17 (2): 145-54
35. Peloquin C (2002). Therapeutic Drug Monitoring in the treatment of tuberculosis. *Drugs* 62(15): 2169-83
36. Peloquin C (2004). Use of Therapeutic Drug Monitoring in Tuberculosis Patients. *Chest*126: 1722-24
37. Prakash J, Velpandian T, Pande J & Gupta S. Serum Rifampicin levels in patients with tuberculosis. *Clin. Drug Invest.* 23(7): 463-72.
38. Raviglione M & Smith I (2007). XDR Tuberculosis – Implications for Global Public Health. *N Engl. J Med*; 356:656-9.
39. Rawls J. Teoría de la justicia (1979). México, Fondo de la Cultura Económica.
40. Ray J., Gardiner I. & Marriott D (2003). Managing antituberculosis drug therapy by therapeutic drug monitoring of rifampicin and isoniazid. *Internal Medicine Journal* 33: 229-34
41. Requena-Méndez A., Davies G., Ardrey A., Jave O., Lopez-Romero S., Ward S. & Moore D. (2012). Pharmacokinetics of Rifampin in Peruvian Tuberculosis Patients with and without Comorbid Diabetes or HIV. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56 (5): 2357-63.
42. Ruslmi R., Nijland H., Alisjahbana B., Parwati I., Crevel R. &Aarnoutse R (2007). Pharmacokinetics and Tolerability of Higher Rifampin Dose versus the Standard Dose in Pulmonary Tuberculosis Patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51(7): 2546-51
43. Shargel L., Wu-Pong S. & Yu A. (2004). Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics. North Caroline. Editorial Mc Graw Hills Access Pharmacy.
44. Tappero J., Bradford W., Agerton T., Hopewell P., Reingold A., Lockman S...&Peloquin C (2005).Serum Concentrations of AntimycobacterialDrugsin Patients with Pulmonary Tuberculosis in Botswana. *TB Drug Malabsorption- CID* (41): 461-9

45. Thomson A (2004). Why do therapeutic drug monitoring. *The Pharmaceutical Journal*, 273: 153-5
46. Tomlin M. (Ed) (2010). Pharmacology and Pharmacokinetics. A basic Reader. London. Springer.
47. Um S.W., Lee S.W., Kwon S.Y., Yoon H.I., Park K.U., Song J...&Lee J.H (2007). Low serum concentrations of anti-tuberculosis drugs and determinants of their serum levels. *Int J. Tuberc Lung Dis*;11 (9):972-8
48. Van der Linde M. (2003). Situación de la Tuberculosis Multidrogo Resistente en el Programa Nacional de Tuberculosis del Perú desde la perspectiva ética y de los Derechos del Enfermo período 1991-2001. Instituto Tecnológico de Santo Domingo. República Dominicana.
49. Weiner M., Burman W., Ernon A., Benator D., Peloquin C., &Khan A (2003). Low Isoniazid Concentrations and Outcome of Tuberculosis Treatment with Once-Weekly Isoniazid and Rifapentine. *Tuberculosis Trials Consortium* Vol. 167:1341-47
50. World Health Organization (2010). Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB). Global Report on Surveillance and Response. WHO/HTM/TB/2010
51. World Health Organization (2013). Global Tuberculosis Report: WHO/HTM/TB/2013.15

ANEXOS

Anexo 1 – Aprobación Comité Ética

Anexo 2 – Aprobación de Adenda

Anexo 3 - Renovación Aprobación Comité de Ética

Anexo 4 – Formato de Consentimiento Informado

Anexo 5 – Artículo: “Validación de un Método de Cromatografía Líquida para la Determinación de Rifampicina en Plasma Humano”

Anexo 1

MINISTERIO DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD

"Decenio de las Personas con Discapacidad en el Perú"
"Año del Centenario de Macchu Picchu para el Mundo"

CONSTANCIA

El que suscribe, Presidente del Comité Institucional de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Salud, deja constancia que el proyecto de investigación titulado "**Monitoreo Terapéutico de Rifampicina e Isoniazida**", ha sido **Evaluado y Aprobado** por nuestro Comité Institucional de Ética en Investigación, no habiéndose encontrado objeciones en dicho protocolo de acuerdo a los estándares propuestos por nuestro Comité, y que se ejecutara bajo la responsabilidad del Químico Farmacéutico **Luís Enrique Moreno Exebio**, en Pacientes de 18 años a más con diagnóstico de tuberculosis pertenecientes al Programa de Tuberculosis del MINSA, que acudan a Centros de Salud – Cabeceras de Microrredes – DISA V – Lima Ciudad, incluyendo los siguientes documentos:

- Protocolo de investigación.
- Formato de Consentimiento Informado.
- Ficha de Reporte de Eventos Adversos Serios (EAS).
- Ficha de Eventos Adversos No Serios
- Ficha de Registro de Participación
- Ficha de Historia Médica

La fecha de aprobación tendrá vigencia desde el 28 de enero del 2011 hasta el 27 de enero del 2012. Los trámites para su renovación deberán iniciarse por lo menos 30 días previos a su vencimiento.

Jesús María, 28 de enero del 2011



F. J. S.

Méd. Duilio Jesús Fuentes Delgado
Presidente
Comité Institucional de Ética en Investigación
Instituto Nacional de Salud

DFD / NLF

Reg. 16733-10
Exp. 055-2010

Anexo 2

MINISTERIO DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD

"Decenio de las Personas con Discapacidad en el Perú"
"Año de la Integración Nacional y el Reconocimiento de Nuestra Diversidad"

MEMORANDO N° 008-2012-CIEI-INS

Para : **Q.F. LUIS ENRIQUE MORENO EXEBIO**
Investigador Principal
Laboratorio de Biodisponibilidad y Bioequivalencia – CNCC

Asunto : **ENMIENDA AL PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN**

Referencia : Carta s/n, del 20 de febrero del 2012.

Fecha : Jesús María, 21 de febrero del 2012

Mediante el presente, expreso a usted mi cordial saludo y a la vez hago de su conocimiento que el Comité Institucional de Ética en Investigación del INS, ha EVALUADO y APRUEBA la ENMIENDA al protocolo titulado: **"MONITOREO TERAPÉUTICO DE RIFAMPICINA E ISONIAZIDA"**, que constan de lo siguiente:

Enmienda al Protocolo de Investigación:

1. Consiste en incluir como lugar para la toma de muestras a la MicroRed Portada de Manchay perteneciente a la DISA II – Lima Sur.

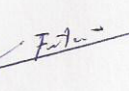
Incluyendo los siguientes documentos:

1. Protocolo de Investigación.
2. Consentimiento Informado.
3. Ficha de Reporte de Eventos Adversos Seros (EAS).
4. Ficha de Eventos Adversos No Serios.
5. Ficha de Registro de Participante.
6. Ficha de Historia Médica.

Sin otro particular, reitero a usted las muestras de mi especial consideración.

Atentamente,




Dr. Duilio Jesús Fuentes Delgado
Presidente
Comité Institucional de Ética en Investigación
Instituto Nacional de Salud

Anexo 3

MINISTERIO DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD

"Decenio de las Personas con Discapacidad en el Perú"
"Año de la Integración Nacional y el Reconocimiento de Nuestra Diversidad"

CONSTANCIA

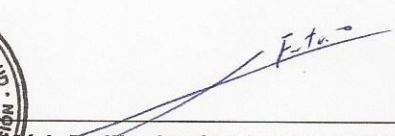
EXTENSION – FECHA DE APROBACION

El que suscribe, Presidente del Comité Institucional de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Salud, deja constancia que se ha **APROBADO** el período de **EXTENSIÓN DE TIEMPO** de la ejecución del proyecto de investigación titulado **"MONITOREO TERAPÉUTICO DE RIFAMPICINA E ISONIAZIDA"**, el que tendrán vigencia de aprobación por el CIEI a partir del 28 de enero del 2012 hasta el 27 de enero del 2013

Los trámites para su renovación deberán iniciarse por lo menos 30 días previos a su vencimiento.

Jesús María, 21 de febrero del 2011




Dr. Duilio Jesús Fuentes Delgado
Presidente
Comité Institucional de Ética en Investigación
Instituto Nacional de Salud

MINISTERIO DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD

DECENIO DE LAS PERSONAS CON DISCAPACIDAD EN EL PERÚ
"Año de la Inversión para el Desarrollo Rural y la Seguridad Alimentaria"

CONSTANCIA

EXTENSION – FECHA DE APROBACION

El que suscribe, Presidente del Comité Institucional de Ética en Investigación (CIEI) del Instituto Nacional de Salud, deja constancia que se ha **APROBADO** el período de **EXTENSIÓN DE TIEMPO** de la ejecución del proyecto de investigación titulado "**MONITOREO TERAPÉUTICO DE RIFAMPICINA E ISONIAZIDA**", el que tendrán vigencia de aprobación por el CIEI a partir del 28 de enero del 2013 hasta el 27 de enero del 2014.

Los trámites para su renovación deberán iniciarse por lo menos 30 días previos a su vencimiento.

Notificar inmediatamente al CIEI-INS de cualquier cambio en el Protocolo (enmiendas), en el Consentimiento Informado o eventos adversos serios.

Jesús María, 05 de febrero del 2013




Med. Elias Wilfredo Salinas Castro

Presidente

Comité Institucional de Ética en Investigación
Instituto Nacional de Salud

Anexo 4

Anexo 1

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del Protocolo: **MONITOREO TERAPÉUTICO DE ISONIAZIDA Y RIFAMPICINA**

Investigador principal: Q.F. Mg. Luis Moreno Exebio / Dr. Leonid Lecca García

Institución: Centro Nacional de Control de Calidad – INS /
Socios en Salud – Sucursal Perú

NATURALEZA Y PROPÓSITO DEL ESTUDIO

Se le está invitando a participar en un estudio de investigación que consiste en cuantificar en sangre, dos de los cuatro medicamentos utilizados para tratar su enfermedad: Rifampicina e Isoniazida.

DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO

Si usted decide participar voluntariamente de este estudio, deberá cumplir con ciertos requisitos:

- Pacientes mayores de 18 años con diagnóstico de tuberculosis
- Acepten quedarse 2-4 horas posterior a la toma de medicamentos para la toma de muestra de sangre
- Que se encuentren dentro del programa de TBC del MINSA
- Haber comenzado en el programa al menos 05 días y tener cultivo positivo o placa de RX con signos de la enfermedad.
- Persistencia de los siguientes signos: fiebre, pérdida de peso, sudoración nocturna, tos productiva.
- Acepten firmar el consentimiento informado
- No debe estar tomando medicamentos adicionales a los que entrega el Programa
- No debe ser dependiente de drogas o alcohol
- No estar embarazada
- No puede haber donado sangre o plasma dentro de los tres meses que anteceden al estudio
- No puede tomar bebidas conteniendo cafeína y xantinas (chocolate, café, té, coca-cola, etc), 12 horas de la toma de muestra de sangre

Si cumple los requisitos, se le indicará que se presente al Centro de Salud antes de la toma de los medicamentos: rifampicina e isoniazida. En el Centro de Salud serán recibidos por los investigadores, quienes supervisarán la ingesta de ambos medicamentos y se le tomará una muestra (01) de sangre a las 2 y 4 horas post ingesta. Se colectará 5 mL de sangre cada vez. Este procedimiento se realizará a los 5 días y a los 2 meses de iniciado el tratamiento. Las muestras de sangre serán codificadas y enviadas al laboratorio del Centro Nacional de Control de Calidad para su análisis.

A los 6 meses se revisará su historia clínica para evaluar su estado de salud.

RESPONSABILIDADES

Como sujeto de un estudio de investigación, cabe mencionar que su participación es totalmente voluntaria, pero el hecho de participar en el mismo, implica ciertas responsabilidades en relación a su participación en el ensayo:

- a) Tomar la medicación del estudio
- b) Permanecer 2-4 horas post ingesta del medicamento para la toma de muestra
- c) Informar de cualquier evento adverso que pueda presentarse

 Instituto Nacional de Salud
Comité de Ética en Investigación
APROBADO
Firma: _____ Fecha: 28/01/11

El Comité de Ética que aprueba el estudio puede supervisar en cualquier momento los derechos y bienestar de los sujetos que participan de este estudio.
Si bien, usted tiene responsabilidades al participar en el estudio, debe tener siempre presente que su participación es voluntaria

RIESGOS

La obtención de la sangre es un procedimiento seguro y puede causar un leve malestar, aparte de una mancha roja pequeña en el lugar de la picada que frecuentemente resuelve sin mayores problemas.

Un efecto adverso más serio, pero menos común es el descenso extremo de la presión arterial, que puede ocurrir también con cualquier medicamento.

Los medicamentos utilizados en este estudio: Rifampicina e Isoniazida tienen efectos adversos conocidos, estos son:

Rifampicina: Hepatitis (inflamación del hígado), reacciones cutáneas, malestar gástrico (náusea, dolor abdominal), fiebre, dolor de cabeza.

Isoniazida: Hepatitis (inflamación del hígado), reacciones cutáneas y neuropatía (daño a los nervios)

BENEFICIOS

Se le entregará una copia de los resultados de laboratorio.

Si la cantidad de estos 2 fármacos (rifampicina e isoniazida) en su sangre, se encuentran por debajo de lo recomendado, el médico tratante podrá a su criterio realizar rápidamente un ajuste de dosis o un cambio de esquema de tratamiento.

DERECHOS DE LOS SUJETOS

Si usted tiene algunas preguntas durante el estudio, ó si a usted le ocurren efectos adversos o lesiones relacionadas a la investigación, se comunicará de inmediato con:

Dr. Leonid Lecca García al teléfono: _____

Las siguientes personas no vinculadas a este estudio a quién usted puede dar quejas acerca de este estudio, así como preguntar sobre sus derechos como participante de esta investigación es: Al Presidente del Comité de Ética del Instituto Nacional de Salud:

Nombre: Dr. Duilio Fuentes Delgado

Teléfono: _____

Firmando este formato de consentimiento, usted no ha renunciado a cualquiera de sus derechos legales.

La participación en este estudio es voluntaria y si usted decide no participar, no perderá ninguno de los derechos del programa de TBC. Si usted decide participar en el estudio y luego cambia de opinión, acerca de participar en el estudio, usted puede retirarse en cualquier momento, pero debe informar inmediatamente al médico de esta decisión; lo cual no influenciará en el cuidado médico u otros beneficios que le dan derecho en el programa.

Usted ó su representante legal serán informados de una manera oportuna cualquier información que pueda afectar su buena voluntad a continuar participando en este estudio.

El médico tiene el derecho de suspender su participación en el estudio en cualquier momento, con o sin su consentimiento, si, determina que es para su bienestar.

Todas las pruebas del estudio son gratuitas.

 Instituto Nacional de Salud
Comité de Ética en Investigación
APROBADO
Firma: _____ Fecha: 28/01/11

CONFIDENCIALIDAD

Todos los registros médicos y materiales de investigación, que lo identifiquen, serán considerados confidenciales hasta el alcance permitido por las leyes aplicables y/o regulaciones, no será hecho público. Si el resultado de este estudio es publicado en la literatura médica, su identidad no será revelada.

Al firmar este consentimiento, usted concede por este medio el permiso para acceder a su historia médica original, al Comité de Ética, quienes han aprobado esta investigación y al grupo investigador.

CONSENTIMIENTO PARA PARTICIPAR EN ESTE ESTUDIO

He leído, ó me han leído la información arriba señalada. El contenido y el significado de esta información me han sido explicados. He tenido la oportunidad de hacer preguntas acerca de este estudio y de esta forma de consentimiento, y he recibido respuestas que resolvieron completamente mis inquietudes. He leído todas las páginas de este consentimiento informado incluidos los riesgos descritos.

Yo, libre y voluntariamente consiento y me ofrezco a participar en este estudio. Firmando este consentimiento, certifico que he tomado en cuenta toda la información, incluyendo mi historia médica; Entiendo que recibiré una copia de este consentimiento.

Autorizo el acceso de mi registro médico al equipo investigador y al Comité de Ética

Firmando este consentimiento yo no renuncio a ninguno de mis derechos legales que tendría como participante de un estudio.

Consiento la extracción de cuatro muestras de sangre durante el estudio, las mismas que serán utilizadas para el dosaje de Rifampicina e Isoniazida. No se va a realizar análisis futuros con mis muestras.

Firma del voluntario
(O representante legal autorizado)

Fecha

Persona que obtiene el consentimiento

Fecha

Testigo (requerido solamente si el sujeto no puede leer)

 Instituto Nacional de Salud
Comité de Ética en Investigación
APROBADO
Firma: _____ Fecha: 28/01/11

Anexo 5

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE CROMATOGRFÍA LÍQUIDA PARA LA DETERMINACIÓN DE RIFAMPICINA EN PLASMA HUMANO

Luis Moreno-Exebio^{1,a}, Miguel Grande-Ortiz^{1,a}

RESUMEN

Objetivos. Validar un método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la determinación de rifampicina (RFP) en plasma humano. **Materiales y métodos.** Se desarrolló un método HPLC para la determinación de RFP en plasma. La separación fue realizada por cromatografía de fase reversa con una columna C18 y una fase móvil compuesta por una mezcla de acetonitrilo y solución amortiguadora de fosfato de potasio monobásico 0,05 M (38:62 v/v) a 335 nm. En el cual se empleó como estándar interno rifampicina quinona (RFP-QN). **Resultados.** Los tiempos de retención de RFP y RFP-QN fueron 7,81 y 12,26 minutos, respectivamente. El ensayo fue lineal de 0,5 a 250 ug/mL. Los parámetros evaluados de precisión, exactitud, selectividad, linealidad, recuperación cumplieron con lo establecido en las guías internacionales de validación de métodos bioanalíticos. **Conclusiones.** El método HPLC desarrollado es simple, específico, sensible, selectivo y lineal para un amplio rango de concentraciones de RFP en plasma.

Palabras clave: Cromatografía líquida de alta presión; Estudios de validación; Rifampicina (fuente: DeCS BIREME)

VALIDATION OF A LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD FOR RIFAMPICIN DETERMINATION IN HUMAN PLASMA

ABSTRACT

Objectives. To validate the high-performance liquid chromatography method (HPLC) for rifampicin (RFP) determination in human plasma. **Materials and methods.** A HPLC method for RFP determination in plasma was developed. The separation was performed by reversed-phase chromatography with C18 column and a mobile phase composed of a mixture of acetonitrile and monobasic potassium phosphate buffer solution 0.05 M (38:62 v/v) at 335 nm in which standard rifampicin quinone (RFP-QN) was used. **Results.** The retention times of RFP and RFP-QN were 7.81 and 12.26 minutes, respectively. The trial was linear from 0.5 to 250 ug/mL. The evaluated parameters of precision, accuracy, selectivity, linearity, and recovery complied with the established international standards for validation of bioanalytical methods. **Conclusions.** The developed HPLC method is simple, specific, sensitive, selective and linear for a wide range of RFP concentrations in plasma.

Key words: Chromatography, high pressure liquid; Validation studies; Rifampin (source: MeSH NLM).

INTRODUCCIÓN

El monitoreo fármaco terapéutico (MFT) es el proceso de obtener las concentraciones plasmáticas de un fármaco y modificar la dosis basados en los resultados y en la evaluación clínica para optimizar los beneficios terapéuticos, mientras se minimizan sus riesgos por efectos adversos o toxicidad. El monitoreo terapéutico ha sido aceptado para un grupo grande de fármacos, incluyendo los usados en el tratamiento de la tuberculosis ⁽¹⁾. Al igual que en otras enfermedades, el uso de MFT en tuberculosis

permite a los clínicos tomar decisiones informadas respecto al ajuste de la dosis en terapia. En otras palabras, el MFT puede ayudar a identificar que pacientes requieren mayores dosis ^(2,3).

La rifampicina (RFP), así como la isoniacida (INH), causan la mayor y más temprana reducción en el número de *Mycobacterium tuberculosis*; es por ello que ambas drogas son consideradas como los dos principales fármacos para combatir la tuberculosis y forma parte fundamental de los regímenes de primera línea antituberculosos en el Perú y a nivel mundial ^(4,5).

¹ Centro Nacional de Control de Calidad, Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú

^a Químico Farmacéutico

Recibido: 16-09-13 Aprobado: 08-01-14

Citar como: Moreno-Exebio L, Grande-Ortiz M. Validación de un método de cromatografía líquida para la determinación de rifampicina en plasma humano. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2014;31(1):56-61.

Se ha descrito que bajas concentraciones de RFP en el plasma han sido asociadas con falla al tratamiento contra la tuberculosis ⁽⁶⁾. Es así que, la detección temprana de personas que no alcanzan concentraciones plasmáticas adecuadas de RFP o INH, permitiría realizar un oportuno ajuste de dosis o un cambio de esquema de tratamiento. Tales ajustes no se requieren en aquellos pacientes que responden al régimen estándar de cuatro fármacos. No obstante, algunos pacientes que responden lentamente al tratamiento, que tienen una mala absorción, están en riesgo de interacciones medicamentosas o tienen otras enfermedades concomitantes que complican la situación clínica, podrían beneficiarse del MFT con intervenciones oportunas que pueden evitar el desarrollo de resistencia ⁽⁷⁾.

Existen, sin embargo, pocos métodos sencillos y rápidos para determinar la concentración plasmática de RFP en pacientes, lo son mucho menos los que emplean cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La mayoría de métodos existentes demandan procedimientos tediosos o requieren equipamiento especial ⁽⁸⁾. Es por ello que el objetivo de este estudio fue estandarizar un método para determinar la concentración de RFP en el plasma, modificando ciertas condiciones experimentales de los métodos ya existentes para usarlo en el monitoreo terapéutico de pacientes del programa de tuberculosis del Ministerio de Salud del Perú (MINSA).

MATERIALES Y MÉTODOS

SISTEMA CROMATOGRÁFICO

Se empleó un sistema HPLC (LaChrom Elite® HPLC System), el cual estuvo conformado por: una bomba (L-2130), un detector de arreglo de diodos (L-2455), un automuestreador con sistema de enfriamiento (L-2200) y un horno para columna (L-2350). El *software* para la recolección y procesamiento de la información fue EZ Chrom Elite® versión 3.2.1 (Chromatography Data System).

La columna utilizada fue C18 (PurosphereStar®) 150 x 4,6 mm ID, el tamaño de partícula fue de 5 µm (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), con una precolumna 4-mm L X 3,0 mm ID (Lichrospher 100 RP-18e, 5 µm, Merck KGaA, Darmstadt, Germany). La fase móvil estuvo compuesta por una mezcla de acetonitrilo y solución amortiguadora 0,05 M de fosfato de potasio monobásico (0,05 mol/L de fosfato de potasio monobásico KH_2PO_4 ajustado a pH 3,7 con ácido fosfórico) en una proporción 38:62 v/v, con una velocidad de flujo de 1 mL/min a temperatura ambiente. El volumen de inyección y la longitud de onda de cuantificación fueron 20 µL y 335 nm respectivamente. Las muestras se mantuvieron en el automuestreador a 5 °C durante todo el análisis.

REACTIVOS

Se utilizaron estándares primarios de RFP y rifampicina quinona (RFP-QN) de la *United States Pharmacopeia*, acetonitrilo (J.T. Baker, USA), metanol grado HPLC (J.T. Baker, México). Además, se emplearon fosfato de potasio monobásico, y ácido fosfórico (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) de grado analítico. Asimismo, se usó agua grado HPLC (18.2 MΩ), obtenida a través de un equipo purificador de agua Sartorius Stedim Biotech modelo Arium® 611 UV (Gottingen, Germany).

PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN ESTÁNDAR

Se preparó una solución madre de 1000 µg/mL de RFP en metanol. Diferentes volúmenes de la solución madre de RFP se diluyeron en metanol y plasma para producir los estándares de calibración de RFP. Una solución del estándar interno de RFP-QN, se diluyó con metanol a partir de una solución madre para obtener una concentración final de 100 µg/mL. Todas las soluciones fueron almacenadas en tubos de polipropileno a -70 °C. Se prepararon estándares de calibración de RFP a concentraciones de 0,5; 1; 5; 10; 20; 50; 100; 200 y 250 µg/mL añadiendo diferentes volúmenes de solución madre de RFP y 100 µL de solución del estándar interno en 5 mL de plasma.

Se utilizó muestras de control de calidad (McC) ^(9,10) en plasma a concentraciones: baja (1 µg/mL), intermedia (10 µg/mL) y alta (20 µg/mL). Los estándares de calibración y de control de calidad fueron extraídos cada día de análisis con el procedimiento usado para la preparación de muestras.

PREPARACIÓN DE MUESTRAS

En crioviales de 2,0 mL que contienen 100 µL de estándar interno (100 µg/mL) se adicionó 100 µL de cada uno de los estándares de calibración y 100 µL de acetonitrilo, después de mezclar en un vórtex a 2200 rpm por 3 min, se centrifugó a 8000 rpm por 10 min; se inyectó 20 µL del sobrenadante, en el sistema de HPLC. De la misma manera, se preparó un blanco (plasma sin estándar interno) y un blanco cero (plasma más estándar interno).

VALIDACIÓN DEL MÉTODO

Se tomaron en cuenta los parámetros recomendados por la guía de la Food and Drug Administration (FDA) para la validación de métodos bioanalíticos ⁽⁹⁾ y la guía de la European Medicines Agency (EMA) ⁽¹⁰⁾. En las cuales se señala que los parámetros principales de validación son la selectividad, exactitud, precisión, recuperación, curva de calibración y estabilidad. Para la evaluación de estos parámetros se tuvieron las siguientes consideraciones:

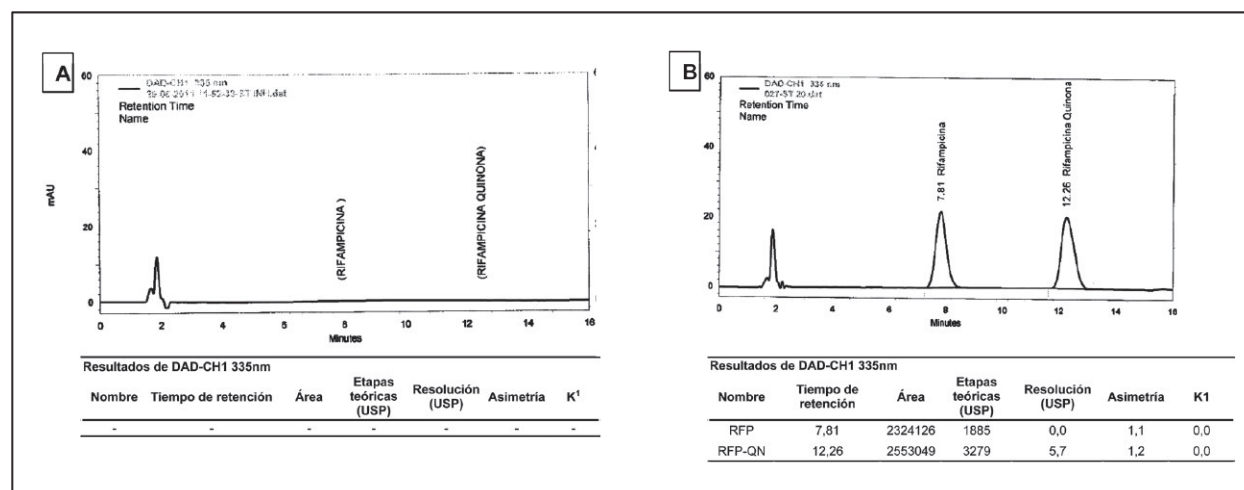


Figura 1. Cromatogramas que muestran la selectividad del método de cromatografía líquida de alta resolución para la determinación de rifampicina en plasma humano

A: mezcla de estándares: etambutol clorhidrato (ETB) USP Lote: HIJ063 + pirazanamida (PZA) USP Lote: ho6198 + isoniacida (INH) USP Lote: IOG205.
B: estándar de rifampicina + rifampicina quinona (estándar interno).

RFP: rifampicina; RFP-QN: rifampicina quinona

Nota: En la parte A se muestra que ninguno de los estándares de INH, PZA y ETB se eluye en el tiempo de 0 a 16 minutos, lo cual muestra la selectividad del método; en la parte B, se observa los tiempos de retención para RFP (7,81 min) y RFP-QN (12,26 minutos).

Selectividad. Se preparó una solución estándar de isoniazida, pirazinamida y etambutol de 40 ug/mL en metanol; inyectándose 20 uL de esta solución en el equipo HPLC. Estos medicamentos se seleccionaron porque se utilizan conjuntamente con la RFP para tratar a los pacientes en el esquema de primera línea del programa de tuberculosis del MINSA.

Linealidad. Se preparó una curva de calibración analizando los estándares de RFP de 9 concentraciones (0,5–250 ug/mL), usando para su evaluación una regresión lineal de mínimos cuadrados.

Exactitud y precisión. Se realizó cinco inyecciones consecutivas del límite más bajo de cuantificación (0,5 ug/mL) y de las McC. La exactitud fue evaluada a través de la desviación del promedio obtenido de las concentraciones 0,5 (es decir, del límite más bajo de cuantificación), 1, 10 y 20 ug/mL (es decir de las McC) en relación a la concentración real del analito. La precisión intradía del método es determinada a través del coeficiente de variación de cada concentración, el cual no debe exceder de 20% para las muestras correspondientes al límite más bajo de cuantificación (LLOQ) y 15% para las McC. El mismo procedimiento se repitió durante cinco días consecutivos para determinar la precisión interdía.

Recuperación. Se preparó cinco inyecciones de las McC en plasma y en fase móvil y se comparó sus concentraciones. El límite más bajo de cuantificación

(LLOQ) fue definido como la concentración más baja sobre la curva de calibración con una precisión de <20% y una exactitud $\pm 20\%$.

RESULTADOS

En relación a la selectividad se observó que, aun cuando fueron analizadas bajo las mismas condiciones cromatográficas que las soluciones de RFP y RFP-QN, ninguna de las soluciones estándar de isoniazida, pirazinamida y etambutol (Figura 1.A) presentan señal que pueda interferir con el tiempo de retención de la RFP (7,8 min) y RFP-QN (12,3 min), conforme se apreciaba en la Figura 1.B.

Tabla 1. Ensayo de linealidad del método de cromatografía líquida de alta resolución para la determinación de rifampicina en plasma humano

Concentración nominal (ug/mL)	Concentración hallada (ug/mL)	Exactitud (%)	DE	CV (%)
0,52	0,49	-6,64	0,07	15,07
1,04	1,2	14,8	0,12	9,66
5,21	5,24	0,52	0,08	1,47
10,43	9,23	-11,43	0,01	0,12
20,85	21,62	3,7	0,21	0,99
52,13	54,44	4,44	0,08	0,15
104,25	104,64	0,37	0,18	0,18
208,51	198,95	-4,58	0,37	0,19
260,63	267,33	2,57	0,09	0,03

DE: desviación estándar, CV: coeficiente de variación

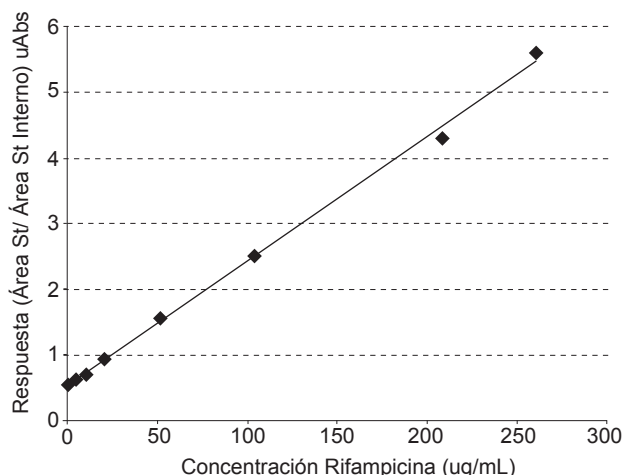


Figura 2. Curva de calibración del método de cromatografía líquida de alta resolución para la determinación de rifampicina en plasma humano

Nota: $Y = 0,019X + 0,5214$, $r^2=0,99$ (regresión lineal de mínimos cuadrados con un factor de peso $1/x^2$)

El ensayo de linealidad fue medido por un análisis de regresión lineal de mínimos cuadrados con un factor de peso $1/x^2$ (Tabla 1). La curva de calibración (Figura 2) de RFP fue $y = 0,019X + 0,5214$ ($r^2=0,99$), correspondiendo al rango de 0,5-250 ug/mL. El LLOQ obtenido con la concentración más baja (0,5 ug/mL) sobre la curva de calibración mostró una precisión de 10% (C.V.) y una exactitud $\pm 10\%$.

El sistema de precisión fue evaluado por área del pico de RFP versus el estándar interno después de cinco inyecciones sucesivas de los estándares de control de calidad (McC). Los valores obtenidos de LLOQ y McC se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Límite de cuantificación, precisión y exactitud del método de cromatografía líquida de alta resolución para la determinación de rifampicina en plasma humano

Analito (n=5)	LLOQ (ng/mL)	McC-A (ng/mL)	McC-B (ng/mL)	McC-C (ng/mL)
Precisión				
Promedio	0,46	1,09	10,08	20,24
DE	0,05	0,07	0,61	1,23
CV (%)	10,03	6,05	6,05	6,07
Exactitud				
Concentración Obtenida	0,46	1,09	10,08	20,24
Concentración nominal	0,51	1,02	10,21	20,41
Exactitud (%)	-10,16	7,12	-1,28	-0,85
DE	0,05	0,07	0,61	1,23

LLOQ: límite más bajo de cuantificación (0,5 ug/mL); McC-A: muestra de control de calidad A (1 ug/mL); McC-B: muestra de control de calidad B (10 ug/mL); McC-C: muestra de control de calidad C (20 ug/mL); DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación

Tabla 3. Recuperación del método de cromatografía líquida de alta resolución para la determinación de rifampicina en plasma humano (n=5)

McC	Concentración nominal (ng/mL)	Promedio de muestras (área)		Recuperación (%)
		Extraída de plasma	En fase móvil	
McC-A	1,02	1198853,20	1421914,00	84,31
McC-B	10,21	1746700,8	1959328,60	89,15
McC-C	20,41	2160241,60	2545659,00	84,86

McC: muestra de control de calidad; McC-A: muestra de control de calidad A (1 ug/mL); McC-B: muestra de control de calidad B (10 ug/mL); McC-C: muestra de control de calidad C (20 ug/mL)

La recuperación promedio alcanzada con este método fue de 86,1%. Los valores obtenidos para cada uno de los puntos de control de calidad se muestran en la Tabla 3.

DISCUSIÓN

El método de cromatografía líquida para la determinación de RFP en plasma humano utilizado en la presente investigación demostró ser bastante selectivo. La corrida cromatográfica (16 min), permitió una selectividad adecuada de la RFP respecto a los otros fármacos de primera línea empleados en el tratamiento antituberculoso. Se puede afirmar que este método es comparable con la separación obtenida con métodos más sensibles, como la cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masa (HPLC-MS) ⁽¹¹⁾.

Los métodos existentes para la determinación de RFP en muestras biológicas han sido validados en un rango de concentraciones que varían generalmente entre 0,4-20 ug/mL ⁽¹²⁾, otros entre 0,25 y 15 ug/mL ⁽⁸⁾. En algunos trabajos recientes se encontró valores por encima de 20 ug/mL ⁽¹³⁾; siendo RFP el fármaco con el más alto potencial de variabilidad entre los fármacos antituberculosos ^(1,14); por esta razón en el presente trabajo se amplió el rango de la curva de calibración de 0,5 hasta 250 ug/mL.

La exactitud hallada estaba dentro de los valores recomendados por la guía de validación de la FDA y EMA, que indica: el valor promedio de McC deben estar dentro del 15% del valor verdadero y 20% para LLOQ. Asimismo, la precisión obtenida cumple lo recomendado, el coeficiente de variación no excede el 15% para las McC y el 20% para LLOQ. Esta exactitud y precisión fue comparable a otros métodos de HPLC ⁽¹⁵⁾. El valor promedio de recuperación del método encontrado en el presente estudio fue 86%, el cual es muy similar al encontrado por Zhou *et al.* realizado

en plasma de pacientes chinos ⁽¹⁶⁾ que alcanzó valores superiores al 83%.

La estabilidad de corto plazo de rifampicina en el plasma fue evaluada comparando las áreas de los McC durante las pruebas de validación, sin hallar variación respecto al área de RFP o RFP-QN a lo largo de corridas cromatográficas de más de 48 horas porque la bandeja del automuestreador se programó a 5 °C.

Una ventaja del método propuesto es que este usa un estándar interno (RFP-QN) de fácil adquisición y bajo costo, en comparación con otros métodos para la cuantificación de RFP que utilizan estándares internos de difícil adquisición por ser sustancias controladas ⁽⁵⁾, o que usan metabolitos activos de costo elevado ^(17,18). Además, la RFP-QN es empleada en la determinación de contenido de RFP en capsulas de la farmacopea de Estados Unidos - USP 35 ⁽¹⁹⁾.

Una limitación debe ser reconocida, la duración de la corrida cromatográfica es relativamente larga en comparación con otros métodos de HPLC-MS. Sin embargo, el método propuesto es simple, preciso y exacto y constituye una buena alternativa para pruebas de monitoreo terapéutico de RFP en el tratamiento de pacientes con tuberculosis.

En conclusión, el método de cromatografía líquida para la determinación de rifampicina en plasma

humano, validado en el presente trabajo constituye una herramienta valiosa. Su uso conjunto con los datos clínicos y bacteriológicos del paciente permitiría tratar los casos más complicados de tuberculosis de una manera adecuada. La validación de este método de cromatografía líquida de alta resolución posibilitaría su implementación como parte del MFT de pacientes del programa nacional de tuberculosis en Perú que se encuentren en tratamiento con drogas de primera línea. Gracias a este método se podría detectar de forma temprana las concentraciones plasmáticas subterapéuticas de RFP en pacientes que se encuentren en mayor riesgo de fracaso al tratamiento ⁽²⁰⁾. Se requieren de estudios costo-beneficio para evaluar la factibilidad de su implementación en hospitales del MINSA.

Agradecimientos: al Dr. Carlos Coimbra, del Instituto Fio Cruz de Brasil, por la el apoyo y las sugerencias durante la preparación del artículo.

Contribuciones de autoría: LME participó en la concepción y diseño del estudio, en la recolección, análisis e interpretación de datos, en la redacción del artículo. MGO ha participado en el análisis e interpretación de datos y revisión crítica del artículo. Ambos autores aprobaron la versión final a publicar.

Fuentes de financiamiento: el presente trabajo fue realizado con fondos provenientes del Instituto Nacional de Salud.

Conflictos de interés: los autores declaran no tener conflictos de interés.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Peloquin CA. *Therapeutic drug monitoring in the treatment of tuberculosis*. *Drugs* 2002;62(15):2169-83.
2. Kang JS, Lee MH. *Overview of therapeutic drug monitoring*. *Korean J Intern Med*. 2009;24(1):1-10. doi: 10.3904/kjim.2009.24.1.1..
3. Requena-Méndez A, Davies G, Ardrey A, Jave O, López-Romero SL, Ward SA, et al. *Pharmacokinetics of rifampicin in Peruvian tuberculosis patients with and without comorbid diabetes or HIV*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2012;56(5):2357-63. doi: 10.1128/AAC.06059-11.
4. Perú, Ministerio de Salud. *Norma Técnica de Salud para el Control de la Tuberculosis*. NTS. N° 041-MINSA/DGSP – V.01. Lima: MINSA; 2006.
5. Zhang Y. *Advances in the treatment of tuberculosis*. *Clin Pharmacol Ther*. 2007;82(5):595-600.
6. Mehta JB, Shantaveerapa H, Byrd RP Jr, Morton SE, Fountain F, Roy TM. *Utility of rifampin blood levels in the treatment and follow-up of active pulmonary tuberculosis in patients who were slow to respond to routine directly observed therapy*. *Chest*. 2001;120(5):1520-4.
7. Peloquin C. *Use of therapeutic drug monitoring in tuberculosis patients*. *Chest*. 2004;126(6):1722-4.
8. Hemanth Kumar AK, Chandra I, Geetha R, Chelvi KS, Lalitha V, Prema G. *A validated high-performance liquid chromatography method for the determination of rifampicin and desacetyl rifampicin in plasma and urine*. *Indian J Pharmacol*. 2004;36(4):231-3.
9. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. *Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation*. Rockville: FDA; 2001.
10. European Medicine Agency (EMA). *Guideline on bioanalytical method validation*. EMEA/CHMP/EWP/192217/2009. London: EMA; 2011.
11. Song SH, Jun SH, Park KU, Yoon Y, Lee JH, Kim JQ, et al. *Simultaneous determination of first-line anti-tuberculosis drugs and their major metabolic ratios by liquid chromatography/tandem mass spectrometry*. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2007;21(7):1331-8.

12. Smith PJ, van Dyk J, Fredericks A. [Determination of rifampicin, isoniazid and pyrazinamide by high performance liquid chromatography after their simultaneous extraction from plasma.](#) Int J Tuberc Lung Dis. 1999;3(11 Suppl 3):S325-8
13. Heysell SK, Moore JL, Keller SJ, Houpt ER.. [Therapeutic drug monitoring for slow response to tuberculosis treatment in a state control program, Virginia, USA.](#) Emerg Infect Dis. 2010;16(10):1546-53. doi: 10.3201/eid1610.100374.
14. Wilkinson GR. [Drug metabolism and variability among patients in drug response.](#) N Engl J Med. 2005;352(21):2211-21.
15. Allanson AL, Cotton MM, Tettey JN, Boyter AC. [Determination of rifampicin in human plasma and blood spots by high performance liquid chromatography with UV detection: a potential method for therapeutic drug monitoring.](#) J Pharm Biomed Anal. 2007;44(4):963-9.
16. Zhou Z, Chen L, Liu P, Shen M, Zou F. [Simultaneous determination of Isoniazid, Pyrazinamide, Rifampicin and Acetylisoniazid in Human Plasma by high performance liquid chromatography.](#) Anal Sci. 2010;26(11):1133-8.
17. Um SW, Lee SW, Kwon SY, Yoon HI, Park KU, Song J, et al. [Low serum concentration of anti-tuberculosis drug and determinants of serum levels.](#) Int J Tuberc Lung Dis. 2007;11(9):972-8.
18. Prakash J, Velpandian T, Pande JN, Gupta SK. [Serum rifampicin levels in patients with tuberculosis: effect of P-Glycoprotein and CYP3A4 blockers on its absorption.](#) Clin Drug Investig. 2003;23(7):463-72.
19. Farmacopea de los Estados Unidos USP 35. Maryland: United Book Press Inc.; 2012.
20. Ray J, Gardiner I, Marriott D. [Managing antituberculosis drug therapy by therapeutic drug monitoring of rifampicin and isoniazid.](#) Intern Med J. 2003;33(5-6):229-34.

Correspondencia: Luis Moreno Exebio

Dirección: Av. Defensores del Morro 2268 – Chorrillos

Teléfono: 6176200- Anexo 1524 – *Celular:* 996728185

Correo electrónico: lemoreno70@hotmail.com / lmoreno@ins.gob.pe

Visite nuestra página en Facebook, www.facebook.com/rpmesp
Infórmese sobre los eventos y los nuevos contenidos
de la Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública

Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública (OFICIAL)

A 928 personas les gusta esta página · 3 personas están hablando sobre esto

Comunidad [?]
 La Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública es el órgano oficial de difusión científica del Instituto Nacional de Salud

Información

Fotos

Me gusta **928**

Notas

Eventos

COMENTARIOS DE SIMPOSIO SALUD
 El simposio de verdad estuvo muy bueno.

31